

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 49/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/32154 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Juli 1999 (01.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07927 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Dezember 1998 (09.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 58 105.6 18. Dezember 1997 (18.12.97) DE (71) Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13342 Berlin (DE). (72) Erfinder: MARESKI, Peter; Koloniestrasse 36, D-13359 Berlin (DE). PLATZEK, Johannes; Grottkauer Strasse 55, D-12621 Berlin (DE). RADÜCHEL, Bernd; Gollanczstrasse 132, D-13465 Berlin (DE). WEINMANN, Hanns-Joachim; Westhofener Weg 23, D-14129 Berlin (DE). BERNDORFF, Dietmar; Eichenallee 42 A, D-16540 Hohen Neuendorf (DE). MISSELWITZ, Bernd; Hattwichstrasse 61, D-16548 Glienicke (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: DENDRITIC POLYMER-SACCHARIDE CONJUGATE, PHARMACEUTICALS CONTAINING SAID CONJUGATE, METHOD FOR ITS PRODUCTION AND USE THEREOF (54) Bezeichnung: DENDRITISCHE POLYMER-SACCHARID-KONJUGATE, DIESE ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE MITTEL, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention concerns conjugates consisting of dendritic polymers amino groups whose branches are produced from vinyl cyanide units, metal ion(s) containing a signal-emitting group or groups and monosaccharides or oligosaccharides and optionally cations of organic and/or inorganic bases, amino acids or amino acid amides. Said conjugates are valuable compounds in diagnosis and therapy.</p> (57) Zusammenfassung <p>Konjugate bestehend auf einem Aminogruppen-enthaltenden dendritischen Polymeren, dessen Zweige aus Vinylcyanid-Einheiten hergestellt sind, Metallion(en) enthaltenden signalgebenden Gruppe(n) und Mono- oder Oligosacchariden sowie gegebenenfalls Kationen anorganischer und/oder organischer Basen, Aminosäuren oder Aminosäureamide sind wertvolle Verbindungen für die Diagnostik und Therapie.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Dendritische Polymer-Saccharid-Konjugate, diese enthaltend
pharmazeutische Mittel, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre
Verwendung**

5

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt Konjugate bestehend aus einem aminogruppen-enthaltenden dendritischen Polymeren, dessen Zweige aus Vinylcyanid-Einheiten hergestellt sind, Metallion(en) enthaltenden signalgebenden Gruppe(n) und Mono- oder

10 Oligosacchariden sowie gegebenenfalls Kationen anorganischer und/oder organischer Basen, Aminosäuren oder Aminosäureamide, diese Verbindungen enthaltende pharmazeutische Mittel, ihre Verwendung in der Diagnostik sowie Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen und Mittel.

- 15 Lymphknotenmetastasen werden in ca. 50-70 % der Patienten mit malignen Tumoren gefunden (Elke, M. Lymphknotenerkrankungen. In: W. Frommhold, H.-S. Stender and P. Thurn (eds.), Radiologische Diagnostik in Klinik und Praxis, 7th edition, Vol. IV, pp. 475-512, Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 1984). Die Beteiligung von Lymphknoten an einer malignen Erkrankung hat be-
- 20 deutenden Einfluß auf die einzuleitenden Therapiemaßnahmen. Die möglichst frühe und möglichst genaue Diagnose eines Lymphknotenbefalls ist daher für den Patienten von größter Bedeutung.

- Die kontrastmittelunterstützte Lymphographie hat in der medizinischen Praxis
- 25 jedoch bisher nur unbefriedigende Ergebnisse geliefert. Röntgenuntersuchungen mit iodierten Ölen, z.B. mit iodierten Fettsäureestern des Mohnöls, zeigen einerseits zwar gute Speicherfähigkeiten in den Lymphknoten und eine brauchbare Kontrastwirkung, sind aber andererseits aufgrund ihrer bekannten Nebenwirkungen (Keinert, K., Köhler, K., and Platzbecker, H., Komplikationen und
- 30 Kontraindikationen. In: M. Lüning, M. Wiljasalo, and H. Weissleder (eds.), Lymphographie bei malignen Tumoren, pp. 40-50. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1976) weder allgemein noch problemlos anwendbar. Sie können, insbesondere bei zu schneller Applikation, im Hinblick auf die leichte Verletzlichkeit der Lymphgefäße Läsionen begünstigen. Eine Reihe von Nachteilen sind im Öl-
- 35 charakter dieser Kontrastmittel begründet. Da die Suspendierung des Öls erst im Blut erfolgt, ist die Größe der Öltröpfchen nicht im voraus bestimmbar. Fallen die Öltröpfchen zu groß aus, sind häufig Mikroembolien, z.B. in der Lunge, un-

vermeidbar. Da die Aufnahme der großen Öltröpfchen aus dem interstitiellen Raum in die Lymphkapillaren kaum möglich ist, gelingt eine Darstellung der Lymphgefäße und Lymphknoten, beispielsweise nach subkutaner oder intraparenchymatöser Injektion, nur in Ausnahmefällen.

5

Der letztgenannte Nachteil ist nur durch endolymphatische Applikation zu überwinden, wobei jedoch eine ebenfalls nicht komplikationslose vorherige Farbstoffmarkierung und operative Freilegung der Lymphgefäße unter Lokalanästhesie in Kauf genommen werden muß. Ein weiterer Nachteil ist darin zu
10 sehen, daß die Kontrastmittel auf Basis iodierter Öle nach erfolgter Applikation nur sehr langsam wieder ausgeschieden werden. In Abhängigkeit von der Zubereitungsform beträgt die Ausscheidungszeit Wochen bis Monate.

Durch Emulgieren der iodierten Öle hat man versucht, die aufgezeigten Nachteile zu überwinden. Dadurch wurde erreicht, die Viskosität und Tröpfchengröße zu verringern. Auf diese Weise konnte die Kapillarpassage verbessert und bei
15 Stabilität der Emulsion das Embolisationsrisiko gesenkt werden. Diese Teilerfolge konnten jedoch nur durch andere Nachteile erkauft werden. Beispielsweise genannt seien in diesem Zusammenhang die effektive Reduktion des Iodgehalts pro ml Kontrastmittel und damit verbunden unausbleiblicher Kontrastverlust, größere Lokaltoxizität am Lymphknoten, hepatotoxische Effekte und histologisch nachweisbare Fremdkörperreaktion, die durch beigefügte Emulgatoren verstärkt werden.
20

Alle Kontrastmittel auf Basis iodierter Öle sind wenig stabil und aufgrund der dargestellten Nebenwirkungen nur begrenzt anwendbar. Auch die in der EP 0 022 056 als Lymphographika vorgeschlagenen Derivate der triiodierten 5-Aminoisophthalsäure haben in der medizinischen Praxis die in sie gesetzten
25 Erwartungen nicht erfüllt, weil sie nach Applikation wieder aus dem Lymphgefäßsystem hinausdiffundieren. Aufgrund ihrer mangelhaften Speicherfähigkeit in den Lymphknoten sind diese wässrigen Zubereitungsformen bestenfalls begrenzt für die periphere Lymphographie geeignet.
30

Wasserlösliche iodierter Röntgenkontrastmittel wie Iotrolan (Isovist®) haben für
35 die Darstellung des lymphatischen Systems nur einen eingeschränkten Anwendungsbereich. Mittels Infusion in den interstitiellen Raum (intrakutan, subkutan bzw. intramuskulär) werden ebenfalls nur die im Einzugsbereich der Infusions-

stelle befindlichen Lymphgefäße bzw. -knoten kontrastreich dargestellt. Die hochwasserlöslichen, niedermolekularen Substanzen diffundieren anschließend aus den Lymphgefäßen in das Interstitium. Dieser Nachteil kann auch nicht durch die empfindliche Methode der Computertomographie kompensiert werden.

In der Nuklearmedizin werden radioaktive ^{99m}Tc -Tracer für die indirekte Lymphknoten-Darstellung eingesetzt. Neben der limitierten räumlichen Auflösung gelten auch hier die Nachteile, daß nur die die Injektionsstelle versorgenden Lymphbahnen dargestellt werden.

Als Lymphographika für die Kernresonanztomographie sind auch superparamagnetische Eisenoxidpartikel, z.B. AMI-227, vorgeschlagen worden (Guimaraes, R., Clement, O., Bittoun, J., Carnot, f., and Frija, G. MR lymphography with superparamagnetic iron nanoparticles in rats: pathologic basis for contrast enhancement. Am. J. Roentgenol., 162, 201-207, 1994). Die bisher am Tier gewonnenen Untersuchungsergebnisse weisen jedoch auf eine unbefriedigende Bildgebung trotz hoher Dosierung der Partikel hin.

Verschiedene als Lymphographika vorgeschlagene Verbindungen (Hanka, L. et al., Radiology 1996, 198, 365-370) zeigen eine derartige Tierspezifität (Ratte vs. Meerschweinchen und Kaninchen), daß ihre Weiterentwicklung eingestellt werden mußte.

Es bestand daher weiterhin die Aufgabe, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die sich nach parenteraler Applikation im Lymphgewebe anreichern und die oben genannten Nachteile nicht besitzen, z.B. gegenüber den bekannten Strukturen einen günstigeren Sicherheitsabstand zwischen diagnostischer und letaler Dosis ("margin of safety") aufweisen. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Konjugate bestehend aus einem aminogruppen-enthaltenden dendritischen Polymeren, dessen Zweige aus Vinylcyanid-Einheiten hergestellt sind, Metallion(en) enthaltenden signalgebenden Gruppe(n) und Mono- oder Oligosaccharide sowie gegebenenfalls Kationen anorganischer und/oder organischer Basen, Aminosäuren oder

Aminosäureamide sich überraschenderweise hervorragend zur Herstellung von NMR-Diagnostika, insbesondere für die Lymphographie eignen.

So weisen sie überraschenderweise folgende Vorteile auf:

5

- eine für eine gute Bildgebung ausreichende Anreicherung im Lymphsystem,
 - eine hohe Verträglichkeit (LD₅₀),
 - eine geringe Ausscheidungszeit (sie werden in der Regel innerhalb von
- 10 14 Tagen zu mehr als 98 % aus dem Körper ausgeschieden),
- ihre hohe Relaxivität erlaubt es, sie in geringer Dosierung zu applizieren,
 - sie ermöglichen oft sogar eine morphologische Differenzierung des Lymphknotengewebes,
 - sie zeigen keine abweichenden Tierspezifitäten.

15

Die erfindungsgemäßen Konjugate lassen sich durch die allgemeine Formel I beschreiben:



20

worin

- P für ein k Aminogruppen - von denen (n + m) jeweils um ein Wasserstoffatom vermindert sind - enthaltendes dendritisches Polymer, dessen Zweige
- 25 aus Vinylcyanid-Einheiten hergestellt sind, wobei (n + m) ≤ k sein soll,
n und m jeweils für die ganzen Zahlen 1 - 149,
k für die Zahlen 12 bis 150,
K für eine Metallion(en) enthaltende signalgebende Gruppe,
L für einen Linker und
- 30 Z für ein um eine Hydroxylgruppe vermindertes Mono- oder Oligosaccharid stehen.

- Das für P stehende, k Aminogruppen enthaltende, von denen (n + m) jeweils um
- 35 ein Wasserstoffatom vermindert sind, Polymer ist ein aus Vinylgruppen-Einheiten hergestelltes Dendrimer wie es in den Patentschriften WO 93/14147, WO 93/12073, WO 95/02008, WO 95/20619, WO 96/02588, EP 684044, EP

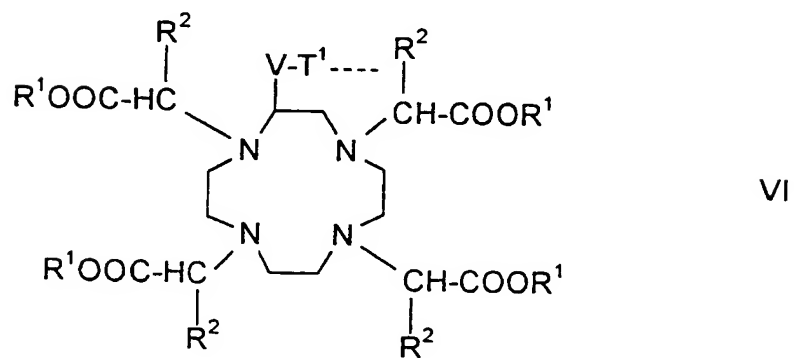
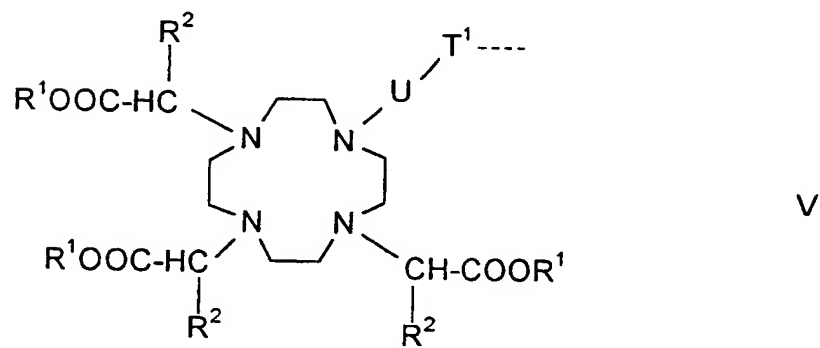
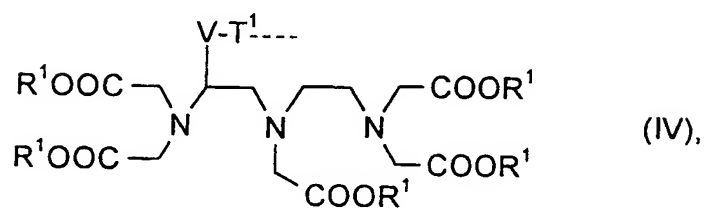
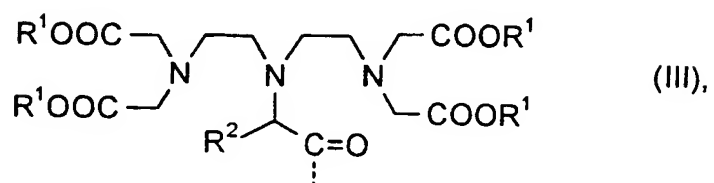
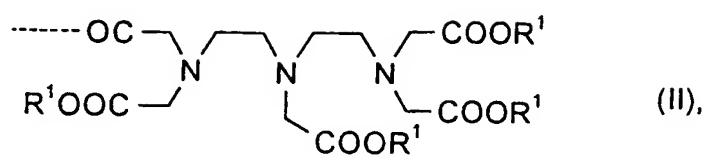
672703 und US-5,530,092 beschrieben wird und welche DSM-Polyamine
5 genannt werden, wobei die repetitierenden Einheiten 3-Amino-propylen- oder 3-
Amino-2-methyl-propylen-Gruppen sind [vgl. auch Seite 34 und 35 für die
entsprechenden Formeldarstellungen]. Bevorzugt ist die Summe $(n + m)$ der
signalgebenden Gruppen (K) und der über L gebundenen jeweils um eine
Hydroxylgruppe verminderten Mono- oder Polysaccharide (Z) gleich der Anzahl
10 k der im Polymeren enthaltenen Aminogruppen, d.h. es liegt eine vollständige
Besetzung der in P enthaltenen Aminogruppen vor. Die Polymere enthalten
bevorzugt 32 oder 64 Aminogruppen, von denen z.B. 3, 4, 6, 7, 8, 11, 13, 14,
16, 18, 19, 21, 47 an signalgebende Gruppen K und z.B. 9, 8, 18, 17, 16, 13,
11, 10, 20, 6, 29, 27, 33 an über L gebundene jeweils um eine Hydroxylgruppe
15 verminderte Mono- oder Polysaccharide Z gebunden sind.

Bei einer Unterbesetzung der Aminogruppen ist die Summe $(n + m)$ bevorzugt \geq
k - 4.

20

Die signalgebende Gruppe K ist ein Chelatkomplex bestehend aus einem Rest
der allgemeinen Formel II, III, IV, V oder VI.

25

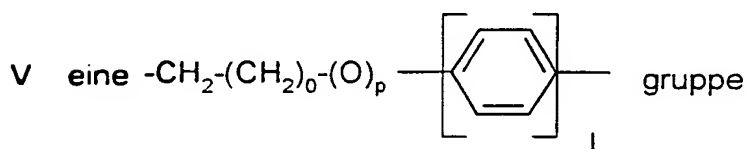


worin

5 R^1 unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder ein Metallionen-
äquivalent der Elemente der Ordnungszahlen 20-32, 37 - 39, 42 - 44,
49 oder 57 - 83,

R^2 ein Wasserstoffatom, einen geradkettigen oder verzweigten C_1 - C_7 -
Alkylrest, einen Phenyl- oder Benzylrest,

10



mit

15 o in der Bedeutung der Zahlen 0 - 10,

p und l jeweils in der Bedeutung der Ziffern 0 oder 1, mit der Maßgabe, daß p
nur dann für die Ziffer 1 steht, wenn l die Ziffer 1 bedeutet,

T¹ eine -NHCS- oder -CO-gruppe,

20 U eine $-CHR^3-CONR^3-M^1$ - oder $-CH_2-CH(OH)-M^2$ -gruppe mit R^3 unabhängig
voneinander in der Bedeutung von R^2 oder der Gruppe $-CH_2-(CH_2)_0-$
COOH und M^1 und M^2 jeweils in der Bedeutung eines Phenylenrestes oder
einer geradkettigen, verzweigten, gesättigten oder ungesättigten C_1 - C_{20} -
Alkylkette, die gegebenenfalls substituiert ist durch 1-5 $(CH_2)_0$ -COOH,
1-5OR²-reste oder 1-8 Sauerstoffatome, 1-2-NH-, 1-2-C(=NH)-, 1-5-
25 CONR³-, 1-5-NR³CO-, 1-2 Phenylen- oder 1-2 Phenylenoxygruppen ent-
hält, bedeuten, mit der Maßgabe, daß mindestens zwei der Rest R^1 für
Metallionenäquivalente der Elemente der oben genannten Ordnungszahlen
stehen.

30 Ist die erfindungsgemäße Verbindung zur Anwendung in der NMR-Diagnostik
bestimmt, so muß das Metallion der signalgebenden Gruppe paramagnetisch
sein. Dies sind insbesondere die zwei- und dreiwertigen Ionen der Elemente
der Ordnungszahlen 21 - 29, 42, 44 und 58 - 70. Geeignete Ionen sind
beispielsweise das Chrom(III)-, Eisen(II)-, Kobalt(II)-, Nickel(II)-, Kupfer(II)-,

Praseodym(III)-, Neodym(III)-, Samarium(III)- und Ytterbium(III)-ion. Wegen ihres starken magnetischen Moments sind besonders bevorzugt Gadolinium(III)-, Terbium(III)-, Dysprosium(III)-, Holmium(III)-, Erbium(III)-, Eisen(III)- und Mangan(II)-ionen.

5

Für die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in der Nuklearmedizin muß das Metallion radioaktiv sein. Geeignet sind zum Beispiel Radioisotope der Elemente Kupfer, Kobalt, Gallium, Germanium, Yttrium, Strontium, Technetium, Indium, Ytterbium, Gadolinium, Samarium, Iridium, Rhenium und Bismut; bevorzugt sind Technetium, Gallium, Indium und Rhenium.

10

Ist die erfindungsgemäße Verbindung zur Anwendung in der Röntgen-Diagnostik bestimmt, so leitet sich das Metallion vorzugsweise von einem Element höherer Ordnungszahl ab, um eine ausreichende Absorption der Röntgenstrahlen zu erzielen. Es wurde gefunden, daß zu diesem Zweck diagnostische Mittel, die ein physiologisch verträgliches Komplexsalz mit Metallionen von Elementen der Ordnungszahlen 25 und 26 sowie 57 - 83 enthalten, geeignet sind.

15

Bevorzugt sind Mangan(II)-, Eisen(II)-, Eisen(III)-, Praseodym(III)-, Neodym(III)-, Samarium(III)-, Gadolinium(III)-, Ytterbium(III)- oder Bismut(III)-ionen, insbesondere Dysprosium(III)-ionen.

20

In R¹ gegebenenfalls vorhandene acide Wasserstoffatome, das heißt diejenigen, die nicht durch das Zentralion substituiert worden sind, können gegebenenfalls ganz oder teilweise durch Kationen anorganischer und/oder organischer Basen oder Aminosäuren oder Aminosäureamide ersetzt sein.

25

Geeignete anorganische Kationen sind beispielsweise das Lithiumion, das Kaliumion, das Calciumion und insbesondere das Natriumion. Geeignete Kationen organischer Basen sind unter anderem solche von primären, sekundären oder tertiären Aminen, wie zum Beispiel Ethanolamin, Diethanolamin, Morpholin, Glucamin, N,N-Dimethylglucamin und insbesondere N-Methylglucamin. Geeignete Kationen von Aminosäuren sind beispielsweise die des Lysins, des Arginins und des Ornithins sowie die Amide ansonsten saurer oder neutraler Aminosäuren.

35

Die erfindungsgemäßen Verbindungen, die ein Molekulargewicht von 5.000 - 200.000 D, vorzugsweise 15.000 - 60.000 D, besitzen, weisen die eingangs geschilderten gewünschten Eigenschaften auf. Sie enthalten die für ihre Verwendung benötigte große Anzahl von Metallionen im Komplex stabil gebunden.

5

Sie reichern sich im Lymphsystem an, erlauben Aussagen über die Perfusion von Geweben, geben die Möglichkeit, das Blutvolumen in Geweben zu bestimmen und die Relaxationszeiten bzw. Densitäten des Blutes selektiv zu verkürzen. Solche physiologischen Informationen sind nicht durch den Einsatz von extrazellulären Kontrastmitteln, wie z.B. Gd-DTPA [Magnevist®], zu erhalten. Aus diesen Gesichtspunkten ergeben sich auch die Einsatzgebiete bei den modernen bildgebenden Verfahren Kernspintomographie und Computertomographie: spezifischere Diagnose von metastasierenden, insbesondere malignen Tumoren und frühe Therapiekontrolle bei zytostatischer, antiphlogistischer oder vasodilatativer Therapie.

15

Die erfindungsgemäßen Saccharid-Polymer-Komplexe eignen sich hervorragend für die interstitielle und besonders für die i.v. Lymphographie.

Als weitere Vorteile gegenüber extrazellulären Kontrastmitteln, wie z.B. Gd-DTPA [Magnevist®], muß die höhere Effektivität als Kontrastmittel für die Kernspintomographie (höhere Relaxivität) hervorgehoben werden, was zu einer deutlichen Reduktion der diagnostisch notwendigen Dosis führt. Gleichzeitig können die erfindungsgemäßen Kontrastmittel als Lösungen isoosmolar zum Blut formuliert werden und verringern dadurch die osmotische Belastung des Körpers, was sich in einer verringerten Toxizität der Substanz (höhere toxische Schwelle) niederschlägt. Geringere Dosen und höhere toxische Schwelle führen zu einer signifikanten Erhöhung der Sicherheit von Kontrastmittelanwendungen bei modernen bildgebenden Verfahren.

25

30

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung liegt darin, daß nunmehr Komplexe mit hydrophilen oder lipophilen, makrocyclischen oder offenkettigen, niedermolekularen oder hochmolekularen Liganden zugänglich geworden sind. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, Verträglichkeit und Pharmakokinetik dieser Polymer-Komplexe durch chemische Substitution zu steuern.

35

Bevorzugte Substituenten für R^2 sind das Wasserstoffatom, die Methyl-, Isopropyl-, Phenyl- und Benzylgruppe. Als für V stehende bevorzugte Gruppen seien beispielhaft genannt die $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ -, $\text{CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_4$ -, $(\text{CH}_2)_4$ -, $(\text{CH}_2)_6$ - und $(\text{CH}_2)_{10}$ -Gruppe, wobei die C_6H_4 -Gruppe an T^1 gebunden ist.

5

Bevorzugte Substituenten für R^3 sind das Wasserstoffatom, die Methyl-, CH_2COOH - und $(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ -Gruppe.




Als Gruppen M^1 seien beispielhaft genannt



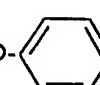
10


α -(CH_2)₁₋₁₀- β , α -CH(CH_3)- β ,

α -CH[$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]- β , α -CH-(C_6H_5)- β

15


α -CH-($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$)- β , α -- β , α -- β , α -- β ,

α -CH₂-- β , α -CH₂-CH₂-O-- β , α -CH₂-CH₂-O--O-CH₂- β ,

α -CH₂-CH₂-O--CH₂- β , α -CH₂-CH(CH_3)- β , α -(CH_2CONH)₁₋₅-CH₂- β ,

α -CH₂-CH₂-O-CH₂- β , α -(CH_2)₂₋₃-(OCH_2CH_2)₁₋₅-O-(CH_2)₂₋₃- β ,

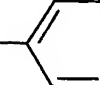
20

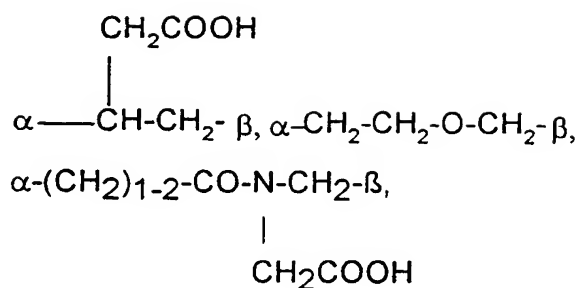
α -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂- β , α -CH $\begin{cases} (\text{CH}_2)_{0-2}\text{-COOH} \\ \text{CH}_2\text{-(CH}_2)_{0-2}\text{-}\beta \end{cases}$, α --CH $\begin{cases} \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{CH}_2\text{-}\beta \end{cases}$,

25

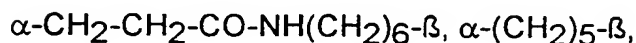
wobei α die Verknüpfungsstelle an den Rest- CONR^3 und β die Verknüpfungsstelle an T^1 angibt.

Bevorzugt sind die Gruppen:

α -CH₂- β , α -(CH_2)₂- β , α -- β ,

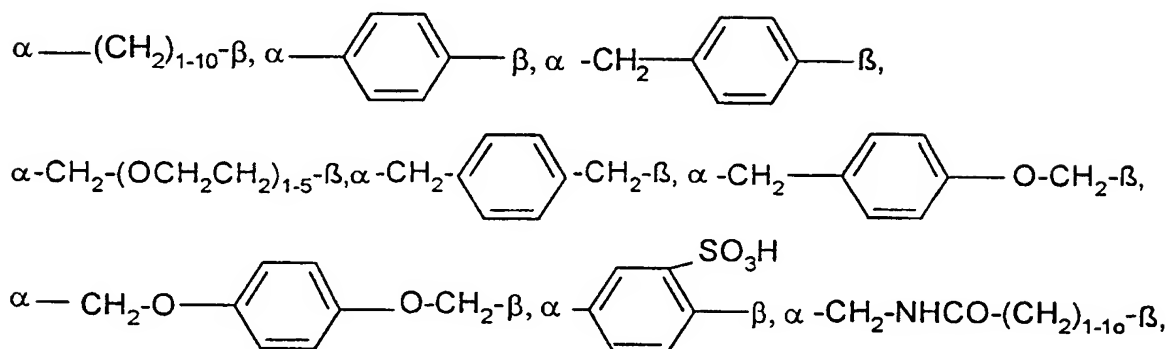


5



Als Gruppen M² seien beispielhaft genannt:

10

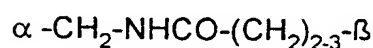
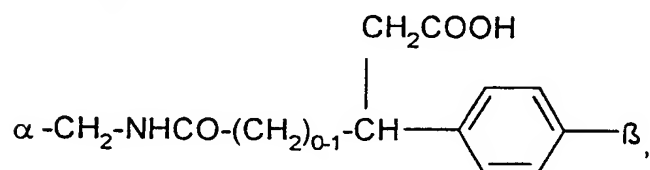
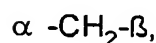


15

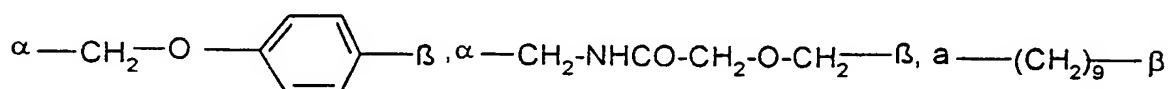
wobei α die Verknüpfungsstelle an den Rest-CH(OH)- und β die Verknüpfungsstelle an T¹ angibt.

Bevorzugt sind die Gruppen:

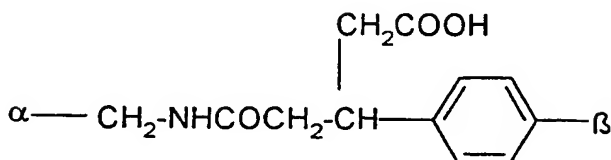
20



25



Besonders bevorzugt ist die Gruppe:



5

Als Gruppen Z seien für die Monosaccharide die jeweils um eine Hydroxylgruppe verminderten Hexosen, Pentosen und N-Acetyl-neuraminsäure, die jeweils in der Pyranose- oder Furanose-Form vorliegen, sowie deren Derivate genannt. Bevorzugt sind Hexosen, die in der Pyranose-Form vorliegen, wie z.B. D-Galactose, D-Mannose, D-Glucose, L-Fucose, Galactose-6-sulfat, Mannose-6-sulfat, D-Glucosamin-6-sulfat, D-Glucosamin-3,4,6-trisulfat und N-Acetylglucosamin. Als bevorzugte Monosaccharide seien beispielhaft die N-Acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucose, -D-Galactose und D-Mannose, die 6-Deoxy-L-Galactose sowie N-Acetyl-neuraminsäure aufgeführt. Steht Z für Oligosaccharide, so können diese linear oder verzweigt aus den oben genannten Monosacchariden aufgebaut sein, wobei die Verknüpfung terminal oder innerhalb der Kette erfolgt sein kann. Als Oligosaccharide seien beispielhaft genannt: Sialyl-Lewis^X (s. z.B. H. Ohmoto et al, J. Med. Chem. 1996, 39, 1339); Desoxy-Sialyl-Lewis^X (s. z.B. W. Stahl et al, Angew. Chemie 1994, 106, 2186); Sialyl-Le^X (s. z.B. W. Stahl, J. prak. Chemie 1995, 337, 441); Gentiobiose (Fluka Chemie AG, Schweiz); Lactose; Maltose; Lactulose (Fluka Chemie AG, Schweiz); LactNAc; N,N',N''-Triacetylchitotriose; Gal(1 $\xrightarrow{\alpha}$ 4)Gal, N,N'-Diacetylchitobiose; N,N',N'',N'''-Tetraacetylchitotetraose; Maltotriose; Digalacturonsäure; Trigalacturonsäure (Carbohydrates International AB, Schweden).

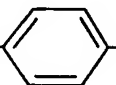
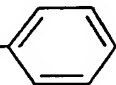
Bevorzugt erfolgt die Bindung des Polymeren (über den Linker L) an die Mono- oder Polysaccharide über die C-2-Position, besonders bevorzugt über die C-1-Position der Zucker.

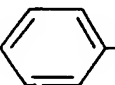
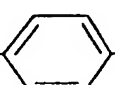
Der Linker L, über den die jeweils um eine Hydroxylgruppe verminderten Mono- oder Oligosaccharide an P gebunden sind, wird durch die Gruppe T²-M³-X beschrieben, wobei M³ für eine direkte Bindung steht oder die für M¹ angegebene

Bedeutung hat, T² für eine -NHCS-, -C(=NH)-, -CH₂- oder CO-gruppe steht und an P bindet, X für NH, CO, O und S steht und an Z bindet. Als M³ seien beispielsweise die Gruppen

5 γ -(CH₂)₁₋₁₅- δ ,

γ -(CH₂CH₂O)₁₋₅-CH₂- δ

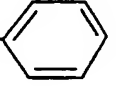
γ -(CH₂CH₂O)₁₋₅-- δ , γ -(CH₂)₁₋₅--(CH₂)₁₋₅- δ ,

γ -(CH₂)₁₋₆-O-- δ , γ -(CH₂)₂₋₆-O--O-CH₂- δ ,

10

γ -CH₂-(C=NH)- δ , γ -C(=NH)-NH-(CH₂)₃- δ ,

γ -NHCO-(CH₂)₂- δ , γ -CH₂CH₂-O-CH₂CH₂- δ , γ -CH₂CH₂-S-CH₂CH₂- δ ,

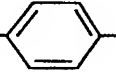
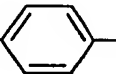
γ -OCH₂- δ , γ -NH-CH(CH₂-) - δ ,

15

genannt, wobei γ die Verknüpfungsstelle an X und δ die Verknüpfungsstelle an T² angibt.

20

Bevorzugt steht M³ für eine direkte Bindung und für die Gruppen

γ -- δ , γ -(CH₂)₁₋₂- δ , γ -(CH₂)₆- δ , γ -(CH₂)₈- δ , γ -(CH₂CH₂O)₄-- δ

γ -(CH₂CH₂O)₁₋₄-CH₂-(CH₂)₀₋₁- δ ,

γ -(CH₂)₂-CONH-(CH₂)₆- δ ,

25

$\begin{array}{c} \text{CH(OH)CH}_2\text{OH} \\ | \\ \gamma\text{-CH-CH(OH)-CH(OH)-}\delta \end{array}$,

γ -(CH₂)₂-CO-(CH₂)₃- δ

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate der allgemeinen Formel I erfolgt in an sich bekannter Weise, daß

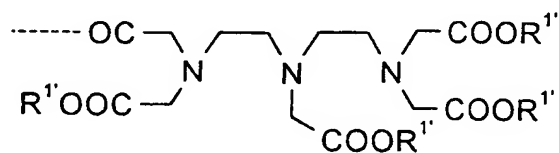
- 5 a) ein Polymer-Komplex(bildner)-Konjugat der allgemeinen Formel VII



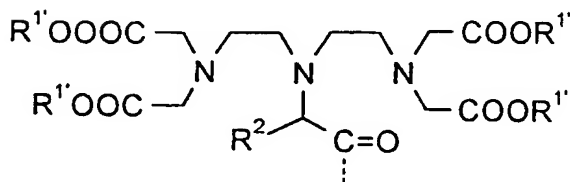
worin

K' für einen Rest der allgemeinen Formel II', III', IV', V' oder VI'

10

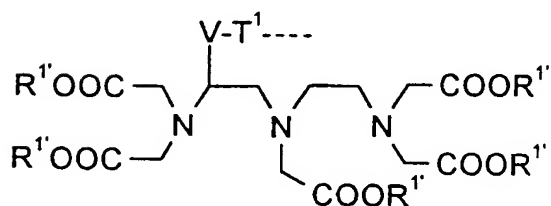


(II'),



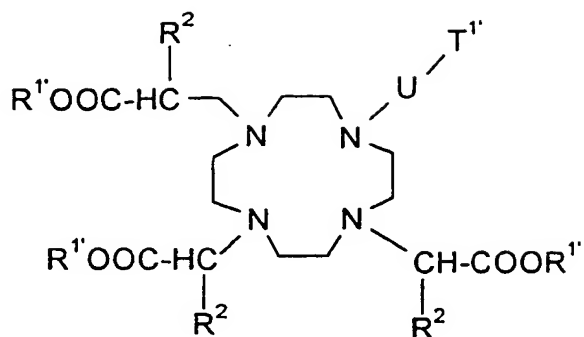
15

(III'),

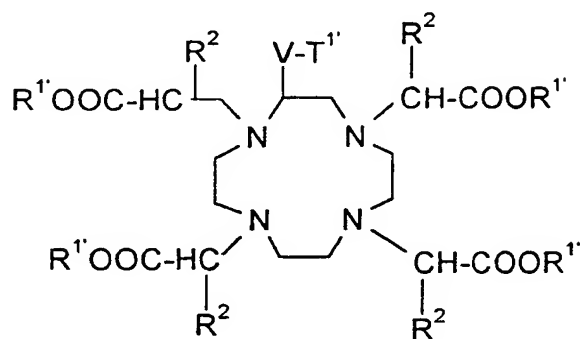


(IV')

20



(V')



(VI')

5

10

worin

$R^{1'}$ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine Säureschutzgruppe oder ein Metallionenäquivalent der Elemente der Ordnungszahlen 20-29, 39, 42, 44 oder 57-83 steht und

15

R^2 , V, o, p, T und U die oben genannte Bedeutung haben, mit n' Mono- oder Oligosacchariden der allgemeinen Formel VIII

 L^*-Z'

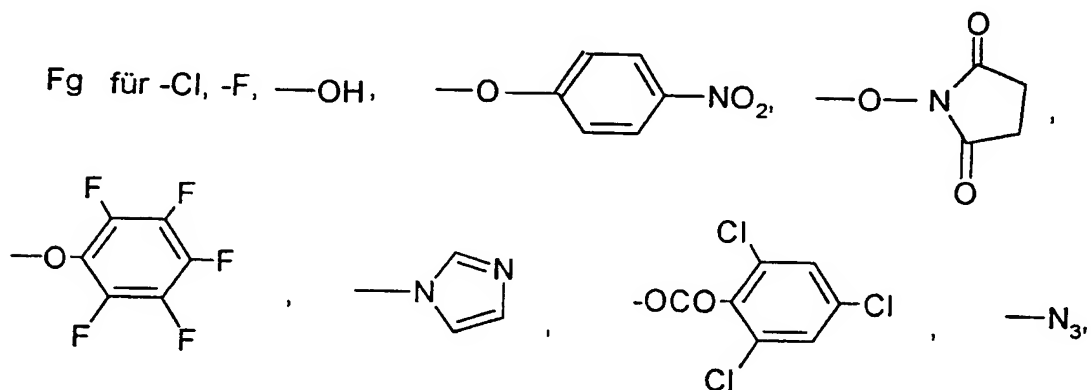
(VIII),

20

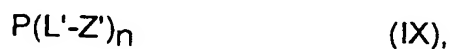
worin

$n' = 1 - 3n$,

- Z' die für Z genannte Bedeutung hat, wobei jedoch die in Z gegebenenfalls enthaltenen Carboxy-, Amino- und Hydroxygruppen gegebenenfalls geschützt sind,
- L* für eine Gruppe T^{2'}-M^{3'}-X mit
- 5 T^{2'} in der Bedeutung von -NCS, -C(=NH)OCH₃, -CHO, einer -CO-Fg-gruppe wobei

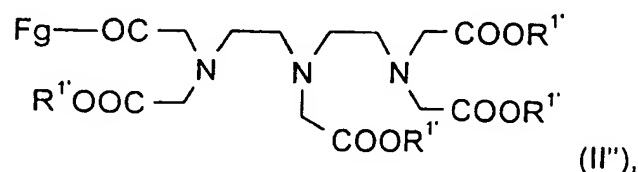


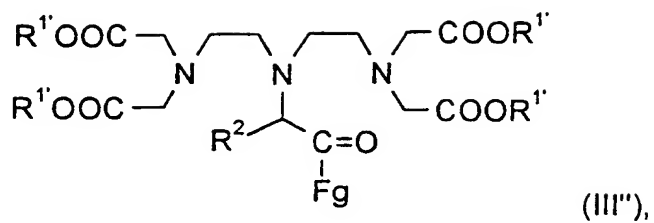
- 10 -O-CO-R⁴ mit R⁴ in der Bedeutung einer geradkettigen oder verzweigten
C₁-C₇-Alkylkette,
M^{3'} die für M³ angegebene Bedeutung hat, wobei jedoch die in M³ gegebenen-
falls enthaltenen Carboxygruppen gegebenenfalls geschützt sind, und
X für NH, CO, O und S steht,
oder
15 b) ein Polymersaccharid-Konjugat der allgemeinen Formel IX



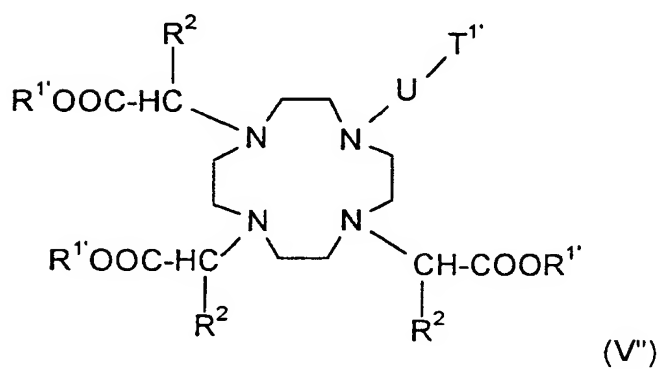
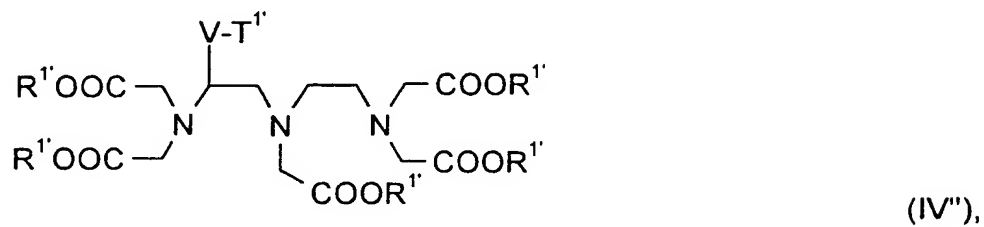
worin

- 20 L' die für L genannte Bedeutung hat, wobei jedoch die in L gegebenenfalls enthaltenen Carboxygruppen gegebenenfalls geschützt sind und P, Z' und n die oben genannte Bedeutung haben, mit m' Komplexen oder Komplexbildnern K*, wobei m' = 1 - 3 m ist und K* für Verbindungen der allgemeinen Formeln

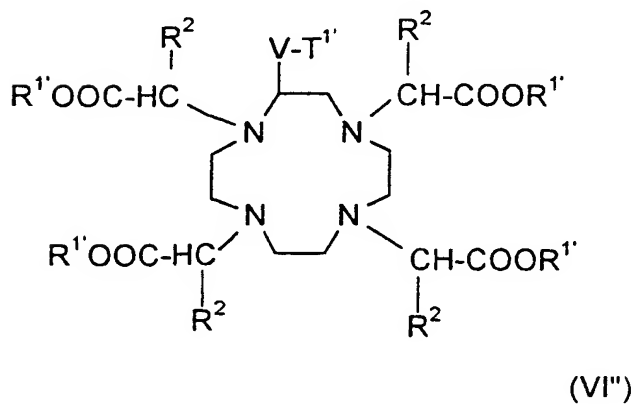


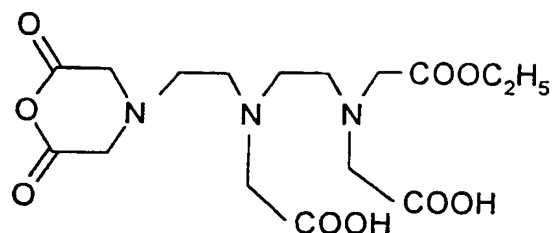


5



10





(II'a),

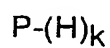
5 worin

5

R^{1'}, R², V, U und Fg die oben genannte Bedeutung haben, und
T^{1'} für -NCS, -CO-Fg, -C(=NH)OCH₃ oder -CHO steht
oder

10

c) ein Polymer der allgemeinen Formel X



(X),

15

worin

P und k die oben angegebenen Bedeutungen haben,
in einer Eintopfreaktion mit n' Mono- oder Oligosacchariden der
allgemeinen Formel VIII

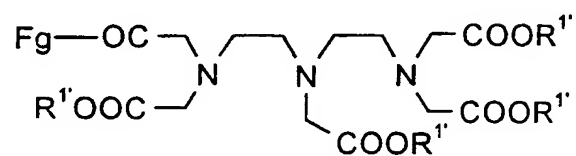
20



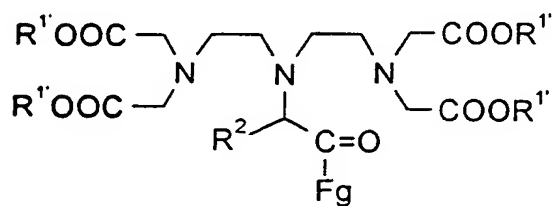
(VIII),

worin

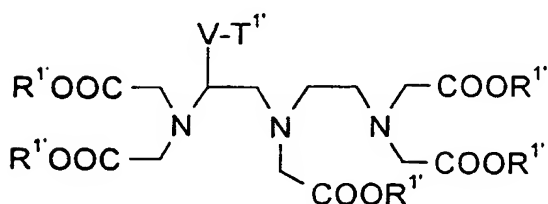
n' , L^* und Z' die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit m' Komplexen oder Komplexbildnern K^* , wobei K^* für Verbindungen der allgemeinen Formeln



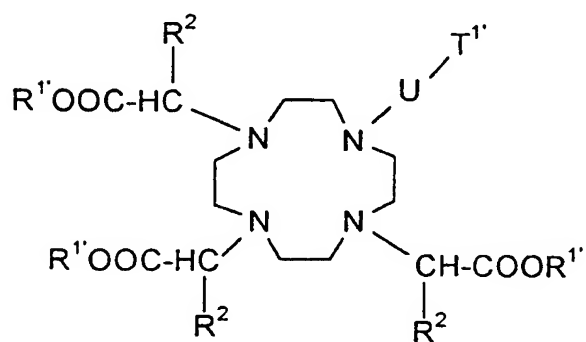
(II''),



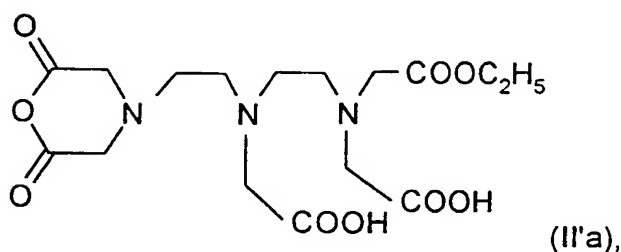
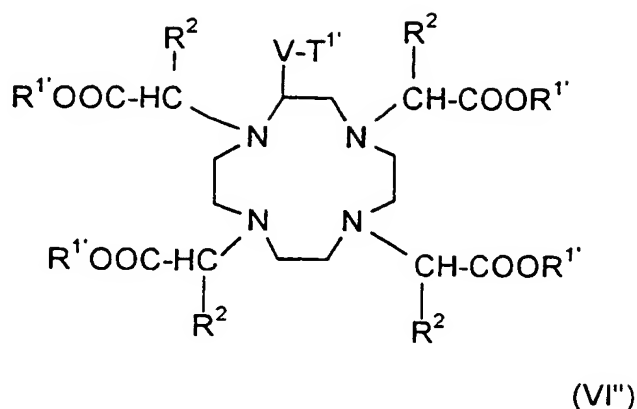
(III''),



(IV''),



(V'')



5

worin m' , $R^{1'}$, R^2 , V , $T^{1'}$, und F_g die oben genannte Bedeutung haben, umgesetzt wird, wobei die gegebenenfalls notwendige Metallioneneinführung vor oder nach der gegebenenfalls notwendigen Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt, mit der Maßgabe, daß, falls $R^{1'}$ für Schutzgruppen steht, diese vor der

10 Metallioneneinführung abzuspalten sind.

Falls $R^{1'}$ für eine Säureschutzgruppe steht bzw. falls die in L' , $M^{3'}$ und Z' enthaltenen Carboxygruppen geschützt sind, kommen niedere Alkyl-, Aryl- und Aralkylgruppen, beispielsweise die Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-,

15 Benzyl-, Diphenylmethyl-, Triphenylmethyl-, bis-(p-Nitrophenyl)-methylgruppe, sowie Trialkylsilylgruppen in Frage.

Die gegebenenfalls gewünschte Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Verfahren (s. z.B. E. Wünsch, Methoden der

20 Org. Chemie, Houben-Weyl, Bd XV/1, 4. Auflage 1974, S. 315), beispielsweise durch Hydrolyse, Hydrogenolyse, alkalische Verseifung der Ester mit Alkali in wäßrig-alkoholischer Lösung bei Temperaturen von 0 °C bis 50 °C, saure Verseifung mit Mineralsäuren oder im Fall von tert.-Butylestern mit Hilfe von Tri-

25 fluoressigsäure.

Als Hydroxyschutzgruppen kommen z.B. die Benzyl-, 4-Methoxybenzyl-, 4-Nitrobenzyl-, Trityl-, Diphenylmethyl-, Trimethylsilyl-, Dimethyl-t-butyl-silyl-, Diphenyl-t-butylsilylgruppe in Frage. Als Schutzgruppe für die 1-OH-Gruppe der Mono- und/oder Oligosaccharide ist auch die Methylgruppe geeignet.

5

Die Hydroxygruppen können auch z.B. als THP-Ether, Alkylether, α -Alkoxyethylether, MEM- und MOM-Ether oder als Ester mit aromatischen oder aliphatischen Carbonsäuren, wie z.B. Essigsäure und Chloressigsäure, Benzoesäure, Levulinsäure oder 2-Chloracetoxymethyl (bzw. ethyl)benzoesäure (GIT Fachz. Lab. 1996, 46) vorliegen. Im Falle von Polyolen können die Hydroxygruppen auch in Form von Ketalen mit z.B. Aceton, Acetaldehyd, Cyclohexanon oder Benzaldehyd geschützt sein.

Bei gleichzeitigem Vorliegen von Carboxylgruppen können Hydroxygruppen auch durch intramolekulare Veresterung zu den entsprechenden Lactonen geschützt vorliegen.

Die Hydroxyschutzgruppen können nach den dem Fachmann bekannten Literaturmethoden, z.B. durch Hydrogenolyse, reduktive Spaltung mit Lithium/Ammoniak, Säurebehandlung der Ether und Ketale oder Alkalibehandlung der Ester freigesetzt werden (siehe z.B. "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W. Greene, John Wiley and Sons 1981).

Als Aminschutzgruppen seien die dem Fachmann geläufigen Benzyloxycarbonyl-, tertiär-Butoxycarbonyl-, Trifluoracetyl-, Fluorenylmethoxycarbonyl-, Benzyl-, Formyl-, 4-Methoxybenzyl-, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl-, Phthaloyl-, 1,2-Oxazolin-, Tosyl-, Dithiasuccinoyl-, Allyloxycarbonyl-, Sulfat-, Pent-4-encarbonyl-, 2-Chloracetoxymethyl (bzw. -ethyl) benzoyl-, Tetrachlorphthaloyl-, Alkyloxycarbonyl-gruppen [Th. W. Greene, P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Syntheses, 2nd ed, John Wiley and Sons (1991), S. 309 - 385, E. Meinjohanns et al, J. Chem. Soc. Pekin Trans 1, 1995, 405; U. Ellensik et al, Carbohydrate Research 280, 1996, 251; R. Madsen et al, J. Org. Chem. 60, 1995, 7920, R.R. Schmidt, Tetrahedron Letters 1995, 5343].

Die unter a) angegebene Umsetzung erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden wie sie z.B. in P. Erbacher et al, Bioconjugate Chem. 1995, 6, 401; G. Molema et al, J. Med. Chem. 1991, 34, 1137; J.L. Montero et al, Bull.

Soc. Chim. France, 1994, 131, 854; P. Midoux et al, Nucleic Acids Research 1993, 21, 871; M. Andersson et al, Bioconjugate Chem. 1993, 4, 246; R. Roy et al, Tetrahedron Letters 1995, 36 4377; U.K. Saha et al, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1995, 2571; C.R. McBroom et al, Methods Enzymol. 1972, 28, 212 beschrieben werden. Sie wird in Lösungsmitteln wie z.B. Wasser, Methylenchlorid, Acetonitril, Chloroform, DMSO, Pyridin, Ethanol/Wasser, Ethanol/Acetonitril, Dioxan, DMF, THF, niedere Alkohole, Tetramethylharnstoff, N-Methylpyrrolidon, Polyethylenglykole, 12-Dimethoxyethan, Dimethylacetamid, 1,2-Dichlorethan oder - falls möglich - deren Mischungen mit Wasser bei Temperaturen von -10 ° C bis 100 °C, bevorzugt 0 bis 50 °C, besonders bevorzugt bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Minuten bis 72 Stunden, bevorzugt 1 bis 24 Stunden, besonders bevorzugt 1 bis 14 Stunden, gegebenenfalls unter Zusatz einer organischen oder anorganischen Base, wie z.B. aromatischen oder aliphatischen Aminen, Alkali- oder Erdalkali-hydroxiden, -carbonaten oder -hydrogencarbonaten und quartären Ammoniumhydroxiden durchgeführt. Beispielhaft genannt seien Triethylamin, Di-isopropyl-N-ethylamin (Hünig-Base), N-Methylmorpholin, Tributylamin, Tetramethylethyldiamin, Pyridin, Lutedin, 2,4,6-Trimethylpyridin, 4-Dimethylaminopyridin, N-Methylimidazol, Tetramethylguanidin, DBU, Lithium-, Natrium-, Kalium, Calcium, Magnesium-, Barium-hydroxid, -carbonat, -hydrogencarbonat. Die Umsetzung kann auch in den dem Fachmann bekannten Pufferlösungen, vorzugsweise bei pH 8 bis 11, besonders bevorzugt bei pH 8,5 bis 9 erfolgen. Die pH-Wert-Einhaltung erfolgt bevorzugt unter Verwendung eines pH-Statens. Steht T^{2'} für eine CHO-Gruppe so wird eine Kupplung durch reduktive Aminierung unter Zuhilfenahme eines Reduktionsmittels nach dem Fachmann bekannten Methoden durchgeführt (J.-P. Sabri et al, Tetrahedron Letters 1994, 35, 1181; M.D. Bomann et al, J. Org. Chem. 1995, 60, 5995; S. Bhattacharyya et al, J. Chem. Soc. Pekin Trans. I 1994, 1; O.S. Artyushin et al., Ser. Khim 1991, 9, 2154; R.F. Borch et al, JACS 1971, 93 2897). Als Reduktionsmittel dienen z.B. Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid, Lithiumborhydrid, Calciumborhydrid, Pyridin-BH₃, Lithiumaluminiumhydrid und Zinkborhydrid. Auch eine katalytische Hydrierung an z.B. Palladium oder Nickelkatalysator ist geeignet.

Steht Fg für eine OH-Gruppe, so kann auch eine in-situ Aktivierung mit den dem Fachmann bekannten Kupplungs-Reagenzien wie z.B. DCCI, EEDQ, Staab-Reagenz, BOP, PyBOP, TBTU, TDBTU, HBTU (s. z.B. Fournic-Zaluski et

al, J. Med. Chem. 1996, 39, 2596; Houben-Weyl, Band XV/2, Teil II, 1974; Y.M. Angell et al, Tetrahedron Letters 1994, 35, 5981; L.A. Carpino et al, J. Chem. Soc. Commun. 1994, 201; H-O. Kim et al, Tetrahedron Letters 1995, 36, 6013; D. Papaioannou et al, Tetrahedron Letters, 1995, 36, 5187, G. Stemple et al,
5 Bioorg. Med. Letters 1996, 6, 55; durchgeführt werden.

Die unter b) angegebene Reaktion des Polymersaccharid-Konjugats der allgemeinen Formel IX mit den Komplexen oder Komplexbildnern K* der allgemeinen Formel II" bis VII" und II'a erfolgt ebenfalls in an sich bekannter Weise wie z.B.
10 beschrieben in US-5,135,737, H. Takalo et al, Bioconjugate Chem. 1994, 5, 278; EP 0430863; EP 0331616; WO 96/01655; EP 0271 180; US-5,364,613; WO 95/17451 und WO 96/02669. Sie wird in Lösungsmitteln wie z.B. Wasser, Methylenchlorid, Acetonitril, Chloroform, DMSO, Pyridin, Ethanol/Wasser, Ethanol/Acetonitril, Dioxan, DMF, THF, niedere Alkohole, Tetramethylharnstoff,
15 N-Methylpyrrolidon, Polyethylenglykole, 12-Dimethoxyethan, Dimethylacetamid, 1,2-Dichlorethan oder - falls möglich - deren Mischungen mit Wasser bei Temperaturen von -10 °C bis 100 °C, bevorzugt 0 bis 50 °C, besonders bevorzugt bei Raumtemperaturen innerhalb von 5 Minuten bis 72 Stunden, bevorzugt 1 bis 24 Stunden, besonders bevorzugt 1 bis 14 Stunden, gegebenenfalls unter
20 Zusatz einer organischen oder anorganischen Base, wie z.B. aromatischen oder aliphatischen Aminen, Alkali- oder Erdalkali-hydroxiden, -carbonaten oder -hydrogencarbonaten und quartären Ammoniumhydroxiden durchgeführt. Beispielsweise genannt seien Triethylamin, Di-isopropyl-N-ethylamin (Hünig-Base), N-Methylmorpholin, Tributylamin, Tetramethylethylendiamin, Pyridin, Lutedin,
25 2,4,6-Trimethylpyridin, 4-Dimethylaminopyridin, N-Methylimidazol, Tetramethylguanidin, DBU, Lithium-, Natrium-, Kalium, Calcium-, Magnesium-, Bariumhydroxid, -carbonat, -hydrogencarbonat. Die Umsetzung kann auch in den dem Fachmann bekannten Pufferlösungen, vorzugsweise bei pH 8 bis 11, besonders bevorzugt bei pH 8,5 bis 9 erfolgen. Die pH-Wert-Einhaltung erfolgt bevorzugt unter Verwendung eines pH-Statens. Steht T^{2'} für eine CHO-Gruppe so wird eine Kupplung durch reduktive Aminierung unter Zuhilfenahme eines Reduktionsmittels nach dem Fachmann bekannten Methoden durchgeführt (J.-P. Sabri
30 et al, Tetrahedron Letters 1994, 35, 1181; M.D. Bomann et al, 7. Org. Chem. 1995, 60, 5995; S. Bhattacharyya et al, J. Chem. Soc. Pekin Trans. I 1994, 1; O.S. Artyushin et al., Ser. Khim 1991, 9, 2154; R.F. Borch et al, JACS 1971, 93
35 2897). Als Reduktionsmittel dienen z.B. Natriumborhydrid, Natriumcyanobor-

hydrid, Lithiumborhydrid, Calciumborhydrid, Pyridin-BH₃, Lithiumaluminiumhydrid und Zinkborhydrid. Auch eine katalytische Hydrierung ist geeignet.

- 5 Die unter a) und b) angegebenen Reaktionen erfolgen vorzugsweise mit einem Überschuß des aktivierten Saccharids der Formel VIII bzw. des aktivierten Komplexes bzw. Komplexbildners K*, vorzugsweise mit einem 1,5- bis 3fachen Überschuß.

- 10 Die unter c) angegebene Eintropfreaktion erfolgt unter den unter a) und b) angeführten Reaktionsbedingungen, indem man ein Polymer der allgemeinen Formel X mit einem Gemisch aus $m' = 1 - 3 m K^*$ und $n' = 1 - 3 n L^* - Z'$ umsetzt. Das Besetzungsverhältnis der im Polymer enthaltenen Aminogruppen wird durch das Verhältnis $n' : m'$ gesteuert.

- 15 Die nach den oben angegebenen Umsetzungen a) - c) notwendige bzw. bereits in K' oder K* erfolgte Metallioneneinführung geschieht in der Weise, wie sie z.B. in der Deutschen Offenlegungsschrift 34 01 052 offenbart worden ist, indem man das Metalloxid oder ein Metallsalz (beispielsweise das Nitrat, Acetat, Carbonat, Chlorid oder Sulfat) des Elements der Ordnungszahlen 20 - 32, 37 - 39,
20 42 - 44, 49, 57 - 83 in Wasser und/oder einem niederen Alkohol (wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol) löst oder suspendiert und mit der Lösung oder Suspension der äquivalenten Menge des komplexbildenden Liganden umsetzt und anschließend, falls gewünscht, vorhandene acide Wasserstoffatome der Säuregruppen durch Kationen von anorganischen und/oder organischen Basen,
25 Aminosäuren oder Aminosäureamiden substituiert.

- Die Neutralisation erfolgt dabei mit Hilfe anorganischer Basen (z.B. Hydroxiden, Carbonaten oder Bicarbonaten) von z.B. Natrium, Kalium, Lithium, Magnesium oder Calcium und/oder organischer Basen wie unter anderem primärer, sekundärer und tertiärer Amine, wie z.B. Ethanolamin, Morpholin, Glucamin, N-Methyl- und N,N-Dimethylglucamin, sowie basischer Aminosäuren, wie z.B. Lysin,
30

Arginin und Ornithin oder von Amiden ursprünglich neutraler oder saurer Aminosäuren, wie z.B. Hippursäure, Glycinacetamid.

5 Zur Herstellung der Komplexverbindungen kann man beispielsweise den sauren Komplexsalzen in wäßriger Lösung oder Suspension so viel der gewünschten Basen zusetzen, daß der Neutralpunkt erreicht wird. Die erhaltene Lösung kann anschließend im Vakuum zur Trockne eingeeengt werden. Häufig ist es von Vorteil, die gebildeten Neutralsalze durch Zugabe von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, wie z.B. niederen Alkoholen (Methanol, 10 Ethanol, Isopropanol und andere), niederen Ketonen (Aceton und andere), polaren Ethern (Tetrahydrofuran, Dioxan, 1,2-Dimethoxyethan und andere) auszufällen und so leicht zu isolierende und gut zu reinigende Kristallisate zu erhalten. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, die gewünschte Base bereits während der Komplexbildung der Reaktionsmischung zuzusetzen und 15 dadurch einen Verfahrensschritt einzusparen.

Enthalten die sauren Komplexverbindungen mehrere freie acide Gruppen, so ist es oft zweckmäßig, neutrale Mischsalze herzustellen, die sowohl anorganische als auch organische Kationen als Gegenionen enthalten.

20

Dies kann beispielsweise geschehen, indem man den komplexbildenden Liganden in wäßriger Suspension oder Lösung mit dem Oxid oder Salz des das Zentralion liefernden Elements und der Hälfte der zur Neutralisation benötigten Menge einer organischen Base umsetzt, das gebildete Komplexsalz isoliert, es 25 gewünschtenfalls reinigt und dann zur vollständigen Neutralisation mit der benötigten Menge anorganischer Base versetzt. Die Reihenfolge der Basenzugabe kann auch umgekehrt werden.

Die Reinigung der so erhaltenen Polysaccharid-Konjugate erfolgt, gegebenenfalls nach Einstellung des pH-Wertes durch Zusatz einer Säure oder Base auf 30 pH 6 bis 8, bevorzugt ca. 7, vorzugsweise durch Ultrafiltration mit Membranen

geeigneter Porengröße (z.B. Amicon-®XM30, Amicon-®-YM10, Amicon-®-YM3) oder Gelfiltration an z.B. geeigneten Sephadex®-Gelen.

- 5 Im Falle von neutralen Verbindungen ist es häufig von Vorteil, die polymeren Komplexe über einen Anionenaustauscher, beispielsweise IRA 67 (OH⁻-Form) und gegebenenfalls zusätzlich über einen Kationenaustauscher, beispielsweise IRC 50 (H⁺-Form) zur Abtrennung ionischer Komponenten zu geben.

- 10 Die Herstellung der als Ausgangssubstanzen benötigten Polymer-komplex(bildner)-Konjugate der allgemeinen Formel VII



und der Polymersaccharid-Konjugate der allgemeinen Formel IX



- 15 erfolgt in an sich bekannter Weise, indem man ein Polymer der allgemeinen Formel X



- mit m' Komplexen oder Komplexbildnern K* der allgemeinen Formeln II'' - VI'' und II'a bzw. mit N' aktivierten Mono- oder Oligosacchariden der allgemeinen
20 Formel VIII



unter den oben unter a) und b) angegebenen Reaktionsbedingungen umgesetzt.

- 25 Die Polymere der allgemeinen Formel X können in Form der freien Amine oder in Form ihrer Salze, z.B. als Hydrochloride, Hydrobromide oder Hydrosulfate eingesetzt werden. Sie sind literaturbekannt (z.B. WO 93/14147, WO 93/12073,

WO 95/02008, WO 95/20619, WO 96/02588, EP 684044, EP 672703 und US-5,530,092).

Die verwendeten Komplexe bzw. Komplexbildner K* sind literaturbekannt oder analog literaturbekannten Methoden erhältlich:

II" und II'a: s.z.B. EP 263 059,

III": s. z.B. DE 19507822, DE 19580858, DE19507819

IV": s. z.B. WO 91/14459

V": s. z.B. US-5,053,503, WO 96/02669, WO 96/01655,

EP 0430863, EP 255471, US-5,277,895, EP 0232751,
US-4,885,363

VI": s. z.B. US-4,923,985

Die als Edukte benötigten Mono- und Oligosaccharide der allgemeinen Formel VIII sind ebenfalls literaturbekannt oder analog literaturbekannten Methoden erhältlich (s. auch experimentellen Teil): s. z.B. EP 0 128097; A.J. Jonas et al. Biochem. J. 1990, 268, 41; JP-Patentschrift 04211099; D.H. Buss et al, J. Chem. Soc. C. 1968, 1457; C.M. Hilditch et al, J. Appl. Phycol. 1991, 3, 345; M. Monsigny et al, Biol. Cell 1984, 51, 187; E.P. Dubois et al, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 1996, 6, 1387; C.R. McBroom et al, Methods Enzymol. 1972, 28, 212; M. Ponpipom et al, J. Med. Chem. 1981, 24, 1388; J. Haensler et al, Bioconjugate Chem. 1993, 4, 85; Y. Miura et al, Carbohydrate Research 1996, 289, 193; R. Roy et al. Tetrahedron Letters 1995, 36, 4377; W. Stahl et al, Angew. Chemie 1994, 106, 2186; U. Sprengard et al, Angew. Chemie 1996, 108, 359; A. Toepfer et al, Tetrahedron Letters 1995, 36, 9161; U. Sprengard et al, Angew. Chemie 1995, 107, 1104; D. Zanini et al, Tetrahedron Letters 1995, 36, 7383; R. Roy et al, J. Chem. Commun. 1996, 201; W. Spevak et al, J. Med. Chem. 1996, 39, 1018; E.A.L. Biessen et al, J. Med. Chem. 1995, 38, 1846; K. Yamada et al, Tetrahedron Letters 1995, 36, 9496; Lemieux et al, JACS 1975, 97, 4076; S. Koto et al, Bull. Chem. Soc. Jap. 1976, 49, 2639; P.W. Austin et al, J. Chem. Soc. C 1965, 1419; H. Paulsen, Angew. Chem. 1990, 102, 851; R.R. Schmidt et al, Angew. Chem. 1986, 98, 213; H. Kunz, Angew. Chem. 1987, 99, 297; J. Banoub, Chem. Review 1992, 92, 1167; H. Paulsen, Angew. Chem.

- 1982, 94, 184, R.R. Schmidt et al, Liebigs Ann. Chem. 1983, 1249; H.A. van Doren et al, Carbohydrate Research 1989, 194, 71, F.D. Tropper et al, J. Carbohydr. Chem. 1992, 11, 751; T. Sugawara et al, Carbohydrate Research 1992, 230, 117, Y.C. Lee et al, Biochemistry 1976, 15, 3956; Blomberg et al, J. Carbohydr. Chem. 1992, 11, 751.

- Die Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel erfolgt ebenfalls in an sich bekannter Weise, indem man die erfindungsgemäßen Komplexverbindungen - gegebenenfalls unter Zugabe der in der Galenik üblichen Zusätze - in wäßrigem Medium suspendiert oder löst und anschließend die Suspension oder Lösung gegebenenfalls sterilisiert. Geeignete Zusätze sind beispielsweise physiologisch unbedenkliche Puffer (wie z.B. Tromethamin), Zusätze von Komplexbildnern oder schwachen Komplexen (wie zum Beispiel Diethylentriaminpentaessigsäure oder die korrespondierenden Ca-Polysaccharid-Polymerkomplexe) oder - falls erforderlich - Elektrolyte wie zum Beispiel Natriumchlorid oder - falls erforderlich - Antioxidantien wie zum Beispiel Ascorbinsäure.

- Sind für die enterale Verabreichung oder andere Zwecke Suspensionen oder Lösungen der erfindungsgemäßen Mittel in Wasser oder physiologischer Salzlösung erwünscht, werden sie mit einem oder mehreren in der Galenik üblichen Hilfsstoff(en) [z.B. Methylcellulose, Lactose, Mannit] und/der Tensid(en) [z.B. Lecithine, Tween®, Myrj®] und/oder Aromastoff(en) zur Geschmackskorrektur [z.B. ätherischen Ölen] gemischt.

- Prinzipiell ist es auch möglich, die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel auch ohne Isolierung der Komplexsalze herzustellen. In jedem Fall muß besondere Sorgfalt darauf verwendet werden, die Chelatbildung so vorzunehmen, daß die erfindungsgemäßen Salze und Salzlösungen praktisch frei sind von nicht komplexierten toxisch wirkenden Metallionen.

Dies kann beispielsweise mit Hilfe von Farbindikatoren wie Xylenolorange durch Kontrolltitrationen während des Herstellungsprozesses gewährleistet

werden. Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung der Komplexverbindungen und ihrer Salze. Als letzte Sicherheit bleibt eine Reinigung des isolierten Komplexsalzes.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel enthalten vorzugsweise
5 1 μ Mol - 1,3 Mol/l des Komplexsalzes und werden in der Regel in Mengen von 0,0001 - 5 mMol/kg dosiert. Sie sind zur enteralen und parenteralen Applikation bestimmt. Die erfindungsgemäßen Komplexverbindungen kommen zur Anwendung.

- 10 1. für die NMR- und Röntgen-Diagnostik in Form ihrer Komplexe mit den Ionen der Elemente mit den Ordnungszahlen 21 - 29, 39 42, 44 und 57 - 83;
2. für die Radiodiagnostik und Radiotherapie in Form ihrer Komplexe mit
15 den Radioisotopen der Elemente mit den Ordnungszahlen 27, 29, 31, 32, 37 - 39, 43, 49, 62, 64, 70, 75 und 77.

Die erfindungsgemäßen Mittel erfüllen die vielfältigen Voraussetzungen für die Eignung als Kontrastmittel für die Kernspintomographie. So sind sie hervor-
20 ragend dazu geeignet, nach oraler oder parenteraler Applikation durch Erhöhung der Signalintensität das mit Hilfe des Kernspintomographen erhaltene Bild in seiner Aussagekraft zu verbessern. Ferner zeigen sie die hohe Wirksamkeit, die notwendig ist, um den Körper mit möglichst geringen Mengen an Fremdstoffen zu belasten, und die gute Verträglichkeit, die notwendig ist, um
25 den nichtinvasiven Charakter der Untersuchungen aufrechtzuerhalten.

Die gute Wasserlöslichkeit und geringe Osmolalität der erfindungsgemäßen Mittel erlaubt es, hochkonzentrierte Lösungen herzustellen, damit die Volumen-
belastung des Kreislaufs in vertretbaren Grenzen zu halten und die Verdünnung
30 durch die Körperflüssigkeit auszugleichen, das heißt NMR-Diagnostika müssen 100- bis 1000fach besser wasserlöslich sein als für die NMR-Spektroskopie. Weiterhin weisen die erfindungsgemäßen Mittel nicht nur eine hohe Stabilität in-vitro auf, sondern auch eine überraschend hohe Stabilität in-vivo, so daß eine Freigabe oder ein Austausch der in den Komplexen nicht kovalent
35 gebundenen - an sich giftigen - Ionen innerhalb der Zeit, in der die neuen

Kontrastmittel vollständig wieder ausgeschieden werden, nur äußerst langsam erfolgt.

Im allgemeinen werden die erfindungsgemäßen Mittel für die Anwendung als
5 NMR-Diagnostika in Mengen von 0,0001 - 5 mMol/kg, vorzugsweise 0,005 - 0,5 mMol/kg, dosiert. Details der Anwendung werden zum Beispiel in H.-J. Weinmann et al., Am J. of Roentgenology 142, 619 (1984) diskutiert.

Besonders niedrige Dosierungen (unter 1 mg/kg Körpergewicht) von organ-
10 spezifischen NMR-Diagnostika sind zum Beispiel zum Nachweis von Tumoren und von Herzinfarkt einsetzbar.

Die erfindungsgemäßen Mittel sind aufgrund ihrer günstigen radioaktiven Ei-
15 genschaften und der guten Stabilität der in ihnen enthaltenen Komplexverbindungen auch als Radiodiagnostika geeignet. Details ihrer Anwendung und Dosierung werden z.B. in "Radiotracers for Medical Applications", CRC-Press, Boca Raton, Florida, beschrieben.

Eine weitere bildgebende Methode mit Radioisotopen ist die Positronen-Emissi-
20 ons-Tomographie, die positronenemittierende Isotope wie z.B. ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{52}Fe , ^{55}Co und ^{68}Ga verwendet (Heiss, W.D.; Phelps, M.E.; Positron Emission Tomography of Brain, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1983).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind überraschenderweise auch zur
25 Differenzierung von malignen und benignen Tumoren in Bereichen ohne Blut-Hirn-Schranke geeignet. Sie zeichnen sich auch dadurch aus, daß sie vollständig aus dem Körper eliminiert werden und somit gut verträglich sind.

Da sich die erfindungsgemäßen Substanzen in malignen Tumoren anreichern
30 (keine Diffusion in gesunde Gewebe, aber hohe Durchlässigkeit von Tumorgefäßen), können sie auch die Strahlentherapie von malignen Tumoren unterstützen. Diese unterscheidet sich von der entsprechenden Diagnostik nur durch die Menge und Art des verwendeten Isotops. Ziel ist dabei die Zerstörung von Tumorzellen durch energiereiche kurzwellige Strahlung mit einer möglichst ge-
35 ringen Reichweite. Hierzu werden Wechselwirkungen der in den Komplexen enthaltenen Metalle (wie z.B. Eisen oder Gadolinium) mit ionisierenden Strahlungen (z.B. Röntgenstrahlen) oder mit Neutronenstrahlen ausgenutzt. Durch

- diesen Effekt wird die lokale Strahlendosis am Ort, wo sich der Metallkomplex befindet (z.B. in Tumoren) signifikant erhöht. Um die gleiche Strahlendosis im malignen Gewebe zu erzeugen, kann bei Anwendung solcher Metallkomplexe die Strahlenbelastung für gesunde Gewebe erheblich reduziert und damit belastende Nebenwirkungen für die Patienten vermieden werden. Die erfindungsgemäßen Metallkomplex-Konjugate eignen sich deshalb auch als radiosensibilisierende Substanz bei Strahlentherapie von malignen Tumoren (weiterhin lassen sich Mössbauer-Effekte oder die Neutroneneinfangtherapie ausnutzen). Geeignete β -emittierende Ionen sind zum Beispiel ^{46}Sc , ^{47}Sc , ^{48}Sc , ^{72}Ga , ^{73}Ga und ^{90}Y . Geeignete geringe Halbwertszeiten aufweisende α -emittierende Ionen sind zum Beispiel ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi und ^{214}Bi , wobei ^{212}Bi bevorzugt ist. ein geeignetes Photonen- und Elektronen-emittierendes Ion ist ^{158}Gd , das aus ^{157}Gd durch Neutroneneinfang erhalten werden kann.
- Bei der in-vivo-Applikation der erfindungsgemäßen therapeutischen Mittel können diese zusammen mit einem geeigneten Träger wie zum Beispiel Serum oder physiologischer Kochsalzlösung und zusammen mit einem anderen Protein wie zum Beispiel Human Serum Albumin verabreicht werden. Die Dosierung ist dabei abhängig von der Art der zellulären Störung, dem benutzten Metallion und der Art der bildgebenden Methode.

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Mittel werden parenteral, vorzugsweise i.v., appliziert.

- Details der Anwendung von Radiotherapeutika werden z.B. in R.W. Kozak et al. TIBTEC, Oktober 1986, 262, diskutiert.

Die erfindungsgemäßen Mittel sind hervorragend als Röntgenkontrastmittel geeignet, insbesondere für die Computertomographie (CT), wobei besonders hervorzuheben ist, daß sich mit ihnen keine Anzeichen der von den jodhaltigen Kontrastmitteln bekannten anaphylaxieartigen Reaktionen in biochemisch-pharmakologischen Untersuchungen erkennen lassen. Besonders wertvoll sind sie wegen der günstigen Absorptionseigenschaften in Bereichen höherer Röhrenspannungen für digitale Substraktionstechniken.

Im allgemeinen werden die erfindungsgemäßen Mittel für die Anwendung als Röntgenkontrastmittel in Analogie zu Meglumin-Diatrizoat in Mengen von 0,1 - 5 mMol/kg, vorzugsweise 0,25 - 1 mMol/kg dosiert.

- 5 Details der Anwendung von Röntgenkontrastmitteln werden zum Beispiel in Barke, Röntgenkontrastmittel, G. Thieme, Leipzig (1970) und P. Thurn, E. Bücheler "Einführung in die Röntgendiagnostik", G. Thieme, Stuttgart, New York (1977) diskutiert.
- 10 Insgesamt ist es gelungen, neue Polymer-Metallkomplexe zu synthetisieren, die neue Möglichkeiten in der diagnostischen und therapeutischen Medizin erschließen.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes:

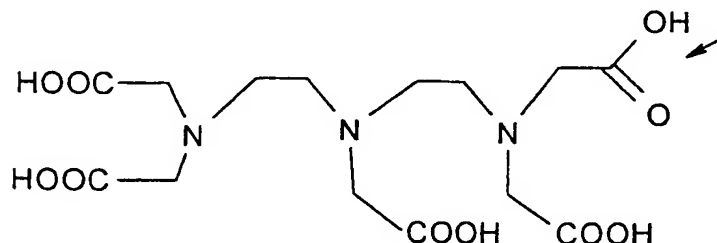
Die in den nachfolgenden Beispielen verwendeten, dem Fachmann bekannten und geläufigen Abkürzungen, bestimmter, häufig wiederkehrender Verbindungsnamen, seien im Folgenden namentlich und/oder durch

20 Strukturformeln einmalig erläutert;

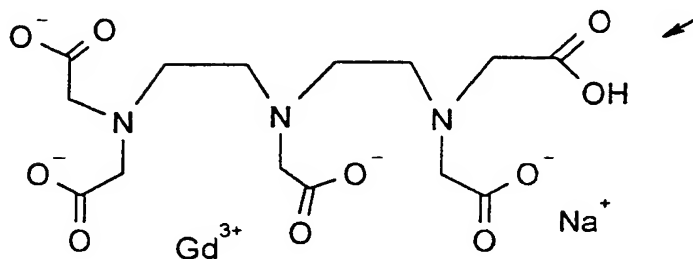
wobei

25 \Leftarrow jeweils die Position in den nachfolgend beschriebenen Molekülen angibt,
über welche die Bindung an das Polymer P erfolgt.

1) DTPA : [Bis-(2-aminoethyl)-amin-N,N,N',N'',N'''- pentaessigsäure]

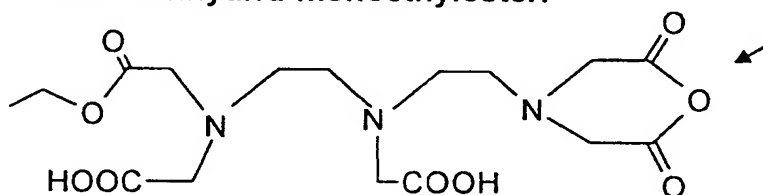


- 2) **Gd-DTPA:** Gadoliniumkomplex von [Bis-(2-aminoethyl)-amin-N,N,N',N'',N''- pentaessigsäure] mono-Natriumsalz



5

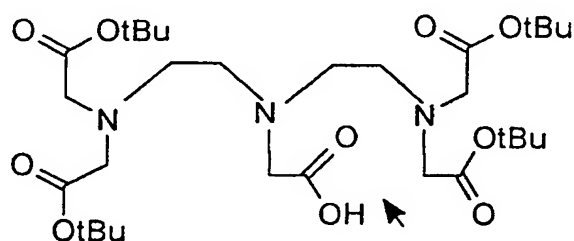
- 3) **DTPA-Monoanhydrid-monoethylester:**



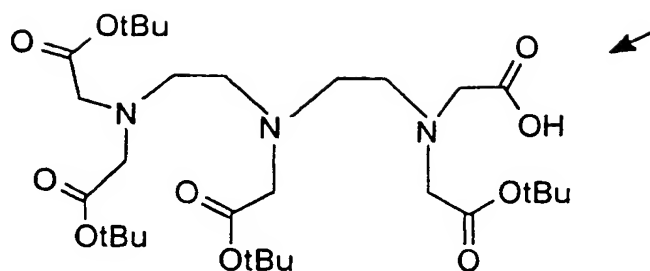
10

- 4) **DTPA-tetra-tert.-butylester (zentrale Carboxymethylfunktion):**
3,9-Bis-(tert.-butoxycarbonylmethyl)-6-carboxymethyl-3,6,9-triazaundecansäure-di-tert.-butylester

15



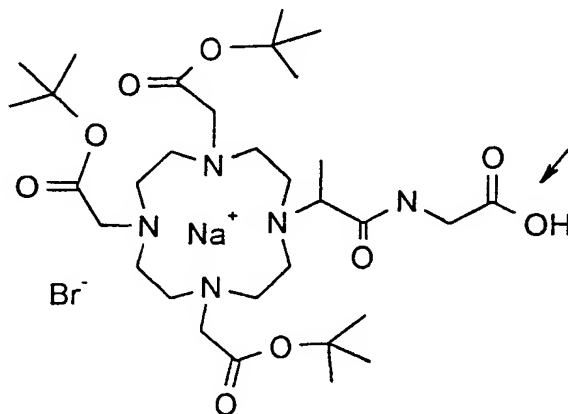
- 20 5) **DTPA-tetra-tert.-butylester (terminale Carboxymethylfunktion):**
6,9-Bis-(tert.-butoxycarbonylmethyl)-3-carboxymethyl-3,6,9-triazaundecansäure-3,9-di-tert.-butylester



5

6) Gly-Me-DOTA-tri-tert.-butylester :

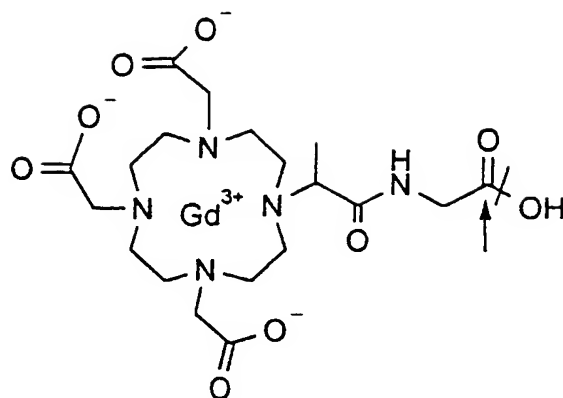
10- [1-(Carboxymethylcarbamoyl)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-
 10 1,4,7- triessigsäure-tri-tert-butylester, Natriumbromid:



15 7) Gd-Gly-Me-DOTA :

Gadoliniumkomplex von 10-[1-(Carboxymethylcarbamoyl)-ethyl]-1,4,7,10-tetraaza-cyclododecan-1,4,7-triessigsäure

35



5

10

8) 64er-DSM-Polyamin:

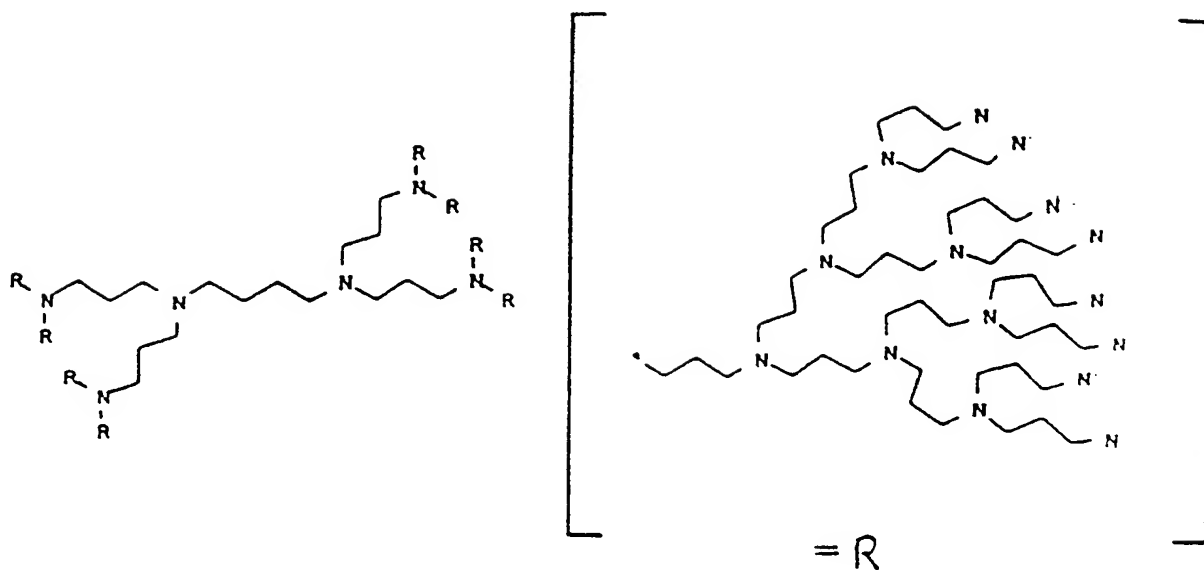
15

20

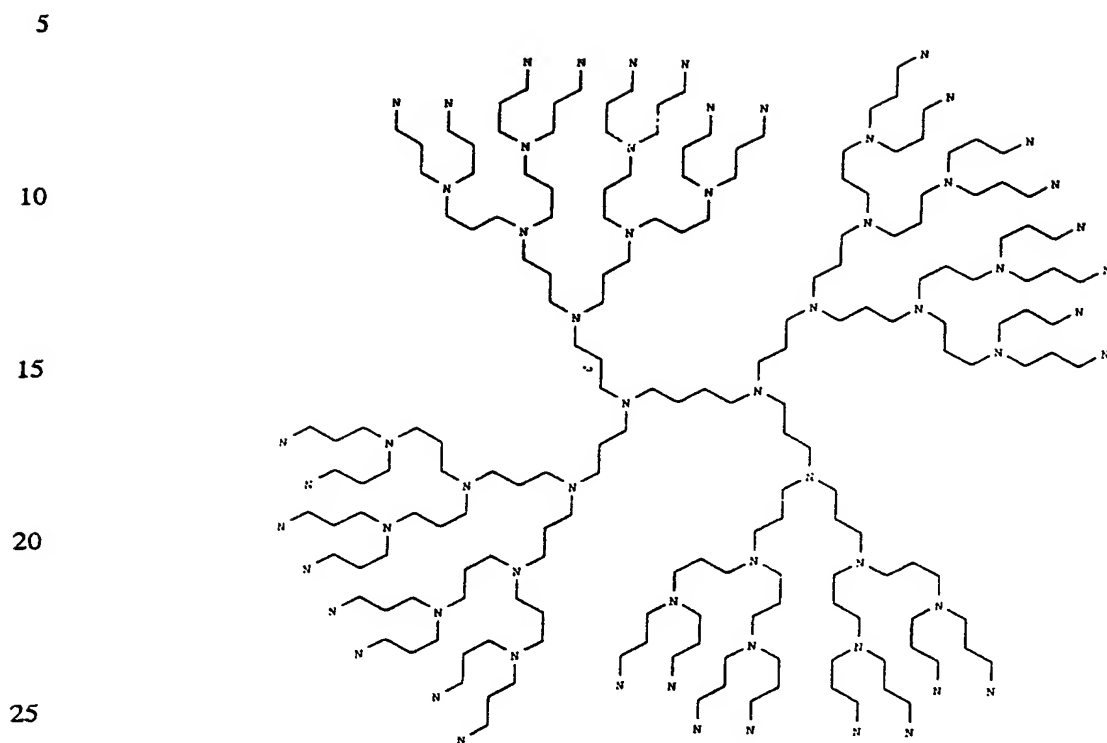
25

30

35



9) 32er-DSM-Polyamin:

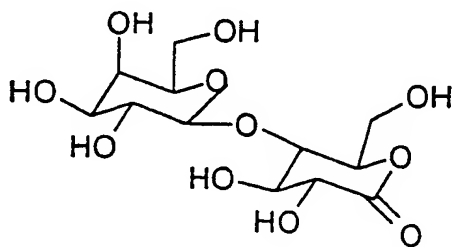


10) Lactobionolacton:

30 O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-D-glucono-1,5-lacton

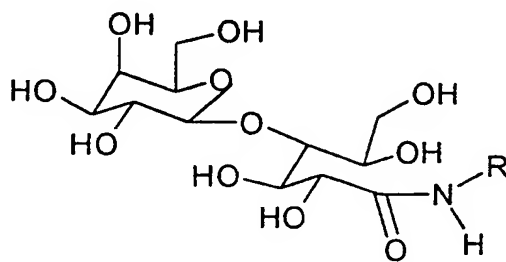
35

40



11) Lactobionolacton-Amid :**O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucono-1,5-lacton - amid**

5



Beispiel 1

- 5 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)- β-D-galactopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

a) Polyamid aus 64er-DSM-Polyamin und DTPA [als Natrium-Salz]

- 10 5,0 g (0,7 mmol ; entsprechend 44,8 mmol an freien Aminfunktionen) 64er-DSM-Polyamin werden in 400 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1 molarer Natronlauge ein pH-Wert von 9.5 eingestellt. Anschließend gibt man insgesamt 21,6 g (53,7 mmol) DTPA-Monoanhydrid-mono-ethylester (Darstellung wie in EP 0263051 A1, EP 0450742 A1 und EP 0413405 A1
- 15 beschrieben) portionsweise hinzu, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 1 molarer Natronlauge konstant bei 9,5 gehalten wird. Nach beendeter Zugabe wird noch 15 Minuten bei Raumtemperatur nachgerührt und anschließend der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 32%iger Natronlauge auf 11,5 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei
- 20 Raumtemperatur wird mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt. Die so erhaltene wässrige Produktlösung wird dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und die wässrige Produktlösung
- 25 gefriergetrocknet.

Ausbeute: 14,04 g (88,3 %; bezogen auf eingesetztes Polyamin) als amorphes Pulver

Wassergehalt: 8,46 %

- 30 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 47,16 H 6,63 N 14,41 Na 7,69

gef.: C 46,88 H 6,79 N 14,32 Na 7,01

- 35 Nach Elementaranalyse als auch colorimetrischer Titration mit 0,0025 molarer Gadoliniumsulfat-Maßlösung, in Gegenwart von Xylenolorange als Indikator, ergibt sich ein DTPA-Beladungsgrad des Polymers von 59,9 % (entsprechend 38 DTPA-Einheiten pro Molekül). Nach quantitativer Ninhydrinreaktion als auch

der quantitativen Aminogruppenbestimmung mit der TNBS-Methode (vgl. hierzu : Fields, R., J. Biochem. 1971, 124, 581-590 und weiterführende Lit.: Chem. Rev., 60, 39 (1960); Tetrahedron, 34, 1285 (1978); 47, 8791 (1991)] liegen im Mittel pro Polymermolekül 25,8 freie Aminofunktionen vor.

5

b) 64er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₃₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)- β-D-galactopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

- 10 1,0 g (0,044 mmol; entsprechend 1,14 mmol an freien Aminofunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 1a) werden in 80 ml entionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung wird mit 1 molarer Salzsäure auf 9,5 eingestellt. Anschließend wird portionsweise mit insgesamt 1,55 g (4,9 mmol) p-Isothiocyanatophenyl-β-D-galactopyranose (Darstellung gemäß: M. Ponpipom
15 et al., J. Med. Chem. 24, 1388; 1981 und J. Haensler et al., Bioconjugate Chem. 4, 85, 1993 ; Zur allgemeinen Bildung von Isothiocyanaten aus den entsprechenden Anilinvorstufen vgl. z.B.: D. H. Buss, I.J. Goldstein; J. Chem. Soc. , 1968, 1457-1461 , McBroom C. R. , Samanen C. H. and Goldstein I.J. , Methods Enzymol. 1972, 28, 212-219) versetzt, wobei der pH-Wert der
20 Reaktionslösung mittels 0,1 molarer Natronlauge bei 9,5 konstant gehalten wird. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei 22°C wird filtriert und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 ml aufgefüllt. Dreimalige Ultrafiltration der Reaktionslösung über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gefolgt von Gefriertrocknung des verbleibenden Rückstands liefert
25 1,30 g (95 % d. Theorie) eines amorphen und farblosen Feststoffs.
Wassergehalt: 3,8 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 47,83	H 6,23	N 11,79	S 2,70	Na 5,66
30 gef.:	C 47,04	H 6,46	N 11,53	S 2,77	Na 5,58

Die Ninhydrinreaktion als auch die TNBS-Methode , welche zur quantitativen Bestimmung von freien Aminofunktionen allgemein eingesetzt werden , verlaufen negativ, d. h. im Polymer liegen keine freien Aminofunktionen vor.

- 35 Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 40 % β-D-Galactose (entsprechend 26 Galactoseresten pro Molekül). Die colorimetrische Phenol-

Schwefelsäure-Bestimmung (Dubois et al., Anal. Chem. 1956, 28, 3, 350) zur Ermittlung des mittleren Pyranose-Beladungsgrades des Polyamins liefert als Ergebnis einen mittleren statistischen Beladungsgrad von 39,68 % an D-Galactoseresten pro Molekül und ist somit als identisch anzusehen mit dem Beladungsgrad, welcher allein durch die prozentualen Elementverhältnisse ermittelt wurde (hier gefunden: 26 D-Galactosereste pro Molekül).

c) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)-β-D-galactopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

1,27 g (0,0411 mmol; entsprechend 1,56 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 1b) werden in 40 ml Natriumcitratpuffer (pH 5,3) gelöst und bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 0,42 g (1,59 mmol) Gadoliniumchlorid in 10 ml destilliertem Wasser versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2 eingestellt. Nach dreimaliger Ultrafiltration über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1,44 g (97,2 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff.

Wassergehalt: 3,89 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,00	H 5,45	N 10,11	S 2,31	Gd 16,53	Na 2,42
gef.:	C 39,87	H 5,74	N 9,98	S 2,28	Gd 16,58	Na 2,42

Aus den molaren Elementverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 60 % Gd-DTPA und 40 % D-Galactose (entsprechend 38 Gd-DTPA-Einheiten und 20-D-Galactoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

Beispiel 2

64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)-α-D-mannopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

a) 64er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -D-mannopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

- 5 In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von 0,75 g (0,033 mmol; entsprechend 0,855 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 1a) mit 1,2 g (3,8 mmol) p-Isothiocyanatophenyl- α -D-mannopyranose [Darstellung gemäß: Monsigny et al., Bio. Cell. 51, (1984), 187] nach Aufarbeitung 0,93 g (92,4 % d. Th.) der oben genannten
- 10 Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff.
Wassergehalt: 4,86 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 47,83	H 6,23	N 11,79	S 2,70	Na 5,66
15 gef.:	C 47,76	H 6,51	N 11,48	S 2,81	Na 5,74

- Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein
- 20 Beladungsgrad des Polymers mit 40 % α -D-Mannose (entsprechend 26 Mannoseresten pro Molekül).

- b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -D-mannopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]
- 25

- 0,85 g (0,027 mmol; entsprechend 1,04 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 2a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben ,mit 0,28 g (1,06 mmol) Gadoliniumchlorid , eingesetzt in Form einer wässrigen
- 30 Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefrier-trocknung erhält man 958,2 mg (98,5 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.
Wassergehalt: 6,14 %

35 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,00	H 5,45	N 10,11	S 2,31	Gd 16,59Na 2,42
gef.:	C 40,02	H 5,61	N 9,82	S 2,24	Gd 16,63Na 2,46

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 60,3 % Gd-DPTA und 39,7 % D-Mannose (entsprechend 38 Gd-DTPA-Einheiten und 26 D-Mannoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar. Die T_1 und T_2 -Relaxivitäten der Titelverbindung wurden sowohl in Wasser, als auch im Plasma bestimmt.

Die Messungen erfolgten bei 40°C, einer Magnetfeldstärke von 0.47 Tesla, der T_1 -Sequenz: $180^\circ - TI - 90^\circ$ [Inversion Recovery] sowie der T_2 -Sequenz: $90^\circ - TE - 180^\circ$ [CPMG].

Alle Relaxivitätsbestimmungen erfolgten auf einem Minispec PC 20 und als Referenzprobe diente in allen Fällen eine Lösung von Gd-DTPA der Konzentration 1 mmol/L.

R_1 (Wasser) = 13.9 ± 0.0 (L/mmol·s)
 R_1 (Plasma) = 17.6 ± 0.2 (L/mmol·s)
 R_2 (Wasser) = 16.8 ± 0.3 (L/mmol·s)
 R_2 (Plasma) = 22.9 ± 1.3 (L/mmol·s)

Beispiel 3

64er-DSM-Polyamin(Gd-DTPA-Amid)₃₈ - [1-(4-Thioureidophenyl)- β -D-glucopyranosyl]₂₆- Konjugat [als Natrium-Salz]

a) 64er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₃₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)- β -D-glucopyranosyl]₂₆- Konjugat [als Natrium-Salz]

In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von 0,9 g (0,04 mmol; entsprechend 1,04 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 1a) mit 1,44 g (4,56 mmol) p-Isothiocyanatophenyl- β -D-glucopyranose [Darstellung gemäß: Monsigny et al., Bio. Cell. 51, (1984), 187 ; M. Ponpipom et al., J. Med. Chem. 24, 1388, (1981)] nach Aufarbeitung 1,12 g (90,6 % d. Th.) eines amorphen und farblosen Feststoffes.

Wassergehalt: 3,75 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 47,83	H 6,23	N 11,79	S 2,70	Na 5,66
gef.:	C 47,76	H 6,51	N 11,48	S 2,81	Na 5,74

5

Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 40 % D-Glucose (entsprechend 26 Glucoseresten pro Molekül).

10

b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)- β-D-glucopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

15

1,0 g (0,032 mmol; entsprechend 1,23 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 3a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,33 g (1,24 mmol) Gadoliniumchlorid , eingesetzt in Form einer wässrigen Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung erhält man 1,14 g (99,2 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver. Wassergehalt: 5,47 %

20

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,00	H 5,45	N 10,11	S 2,31	Gd 16,59Na 2,42
25 gef.:	C 40,98	H 5,38	N 10,22	S 2,40	Gd 16,43Na 2,40

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 60 % Gd-DPTA und 40 % D-Glucose (entsprechend 38 Gd-DTPA-Einheiten und 26-D-Glucosereste pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktionen keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

30

Beispiel 4

5 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -L-fucopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

a) 64er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -L-fucopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

10 In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von 1,1 g (0,048 mmol; entsprechend 1,26 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 1a) mit 1,65 g (5,57 mmol) p-Isothiocyanatophenyl- α -L-Fucopyranose [Darstellung gemäß: Tamio et al., Jpn. Kokai Tokio Koho, Jp 4211099 und Hilditch et al., J. Appl. Phycol. **3** (4), 345,
15 (1991)] nach Aufarbeitung 1,35 g (92,4 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff.
Wassergehalt: 8,03 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

20 ber.:	C 48,48	H 6,32	N 11,95	S 2,74	Na 5,73
gef.:	C 48,02	H 6,28	N 12,01	S 2,70	Na 5,81

Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen
25 Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 40 % α -L-Fucose (entsprechend 26 α -L-Fucoseresten pro Molekül).

30 b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -L-fucopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

1,2 g (0,039 mmol; entsprechend 1,49 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 4a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,40 g (1,51 mmol) Gadoliniumchlorid, eingesetzt in Form einer wässrigen
35 Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung erhält man 1,37 g (98,5 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.
Wassergehalt: 5,81 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,48	H 5,51	N 10,23	S 2,34	Gd 16,78	Na 2,45
gef.:	C 41,31	H 5,54	N 10,17	S 2,38	Gd 16,55	Na 2,48

5

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 60 % Gd-DTPA und 40 % α -L-Fucose (entsprechend 38 Gd-DTPA-Einheiten und 26- α -L-Fucoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen

10

Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

Beispiel 5

15 64er-DSM-Polyamin(Gd-DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)-N-acetyl- β -D-glucosaminopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

a) 64er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)-N-acetyl- β -D-glucopyranosyl]₂₆- Konjugat [als Natrium-Salz]

20

In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von 0,9 g (0,04 mmol; entsprechend 1,26 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 1a) mit 1,61 g (4,56 mmol) 2-[Acetylamino-2-deoxy]-1-[4-(isothiocyanatophenyl)]- β -D-glucopyranose [Darstellung : Jonas,

25

A.J. et. al., Biochem. J. (1990) 268, 1] nach Aufarbeitung 926 mg (92,2 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff.

Wassergehalt: 7,68 %

30

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 44,10	H 4,62	N 9,26	S 3,32	Na 6,96
gef.:	C 44,21	H 6,58	N 9,31	S 3,28	Na 6,92

35

Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein

Beladungsgrad des Polymers mit 40 % 2-[Acetylamino-2-deoxy]-1-phenyl- β -glucopyranose (entsprechend 26 2-[Acetylamino-2-deoxy]-1-phenyl- β -D-glucopyranoseresten pro Molekül).

5

b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)-N-acetyl- β -D-glucosaminopyranosyl]₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

10

0,9 g (0,036 mmol; entsprechend 1,36 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 5a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,38 g (1,45 mmol) Gadoliniumchlorid, eingesetzt in Form einer wässrigen Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung erhält man 1,26 g (92,3 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver. Wassergehalt: 8,46 %

15

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,54	H 5,44	N 10,81	S 2,25	Gd 16,12	Na 2,36
gef.:	C 41,74	H 5,40	N 10,96	S 2,27	Gd 15,99	Na 2,28

20

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 60 % Gd-DTPA und 40 % N-Acetyl-D-Glucosamin (entsprechend 38 Gd-DTPA-Einheiten und 26 N-Acetyl-D-Glucosaminresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr

25

nachweisbar.

Beispiel 6

30

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)- β -D-galactopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

a) Polyamid aus 32er-DSM-Polyamin und DTPA [als Natrium-Salz]

35

Eine Lösung von 5,0 g (1,42 mmol, entsprechend 45,5 mmol an freien Aminfunktionen) 32er-DSM-Polyamin wird in 400 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1 molarer Natronlauge ein pH-Wert von 9,5 eingestellt. Anschließend

- gibt man insgesamt 21,9 g (54,6 mmol) DTPA-Monoanhydrid-mono-ethylester portionsweise hinzu, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 1 molarer Natronlauge konstant bei 9,5 gehalten wird. Nach beendeter Zugabe wird noch 15 Minuten bei Raumtemperatur nachgerührt und
- 5 anschließend der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 32 %iger Natronlauge auf 11,5 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt. Die so erhaltene wässrige Produktlösung wurde dreimal mittels
- 10 eines YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und die wässrige Produktlösung gefriergetrocknet.
- Ausbeute: 15,5 g (91,2 % d. Th.; bezogen auf eingesetztes Polyamin) als amorphes Pulver.
- 15 Wassergehalt: 7,43 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 43,74	H 7,21	N 13,57	Na 13,83
gef.:	C 43,21	H 7,18	N 13,82	Na 13,94

20

- Nach Elementaranalyse als auch colorimetrischer Titration mit 0,0025 molarer Gadoliniumsulfat-Maßlösung in Gegenwart von Xylenolorange als Indikator, ergibt sich ein DTPA-Beladungsgrad des Polymers von 55,8 % (entsprechend 18 DTPA-Einheiten pro Molekül). Nach quantitativer Ninhydrinreaktion als auch
- 25 der quantitativen Aminogruppenbestimmung mit der TNBS-Methode (vgl. hierzu : Fields, R., J. Biochem. 1971, 124, 581-590 und weiterführende Lit.: Chem. Rev., 60, 39 (1960); Tetrahedron, 34, 1285 (1978); 47, 8791 (1991)] liegen im Mittel pro Polymermolekül 14 freie Aminofunktionen vor.

30

- b) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)- β-D-galactopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

- In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von
- 35 1,0 g (0,0835 mmol; entsprechend 1,17 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 6a) mit 1,60 g (5,03 mmol) p-Isothiocyanato-

phenyl- β -D-galactopyranose nach Aufarbeitung 1,25 g (91,3 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff.
Wassergehalt: 8,36 %

5 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 45,34	H 6,65	N 11,12	S 2,74	Na 10,11
gef.:	C 44,98	H 6,51	N 11,02	S 2,68	Na 10,14

10 Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 44 % β -D-Galactose (entsprechend 14 β -Galactoseresten pro Molekül). Die colorimetrische Phenol-Schwefelsäure-

15 mittlere Pyranose-Beladungsgrades des Polyamins liefert als Ergebnis einen mittleren statistischen Beladungsgrad von 43,75 % an β -D-Galactoseresten pro Molekül und ist somit als identisch anzusehen mit dem Beladungsgrad, welcher allein durch die prozentualen Elementverhältnisse ermittelt wurde (hier gefunden : 26 β -D-Galactosereste pro Molekül).

20

c) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- β -D-galactopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

25 1,0 g (0,061 mmol; entsprechend 1,10 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 6b) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,29 g (1,15 mmol) Gadoliniumchlorid , eingesetzt in Form einer wässrigen Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung erhält man 1,05 g (96,2 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.

30 Wassergehalt: 4,93 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,33	H 6,06	N 10,14	S 2,50	Gd 15,76	Na 2,30
gef.:	C 41,28	H 5,97	N 10,08	S 2,52	Gd 15,80	Na 2,28

35

Aus den molaren Elementverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 56 % Gd-DTPA und 44 %

β -D-Galactose (entsprechend 18 Gd-DTPA-Einheiten und 14 D-Galactoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

5

Beispiel 7

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -D-mannopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

10

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -D-mannopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

15 In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von 0,95 g (0,079 mmol; entsprechend 1,11 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 6a) mit 1,52 g (4,77 mmol) p-Isothiocyanatophenyl- β -D-mannopyranose nach Aufarbeitung 1,22 g (96,2 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen
20 Feststoff.
Wassergehalt: 5,93 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 45,34	H 6,65	N 11,12	S 2,74	Na 10,11
25 gef.:	C 45,20	H 6,49	N 11,20	S 2,66	Na 10,21

Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein
30 Beladungsgrad des Polymers mit 44 % α -D-Mannose (entsprechend 14 α -D-Mannoseresten pro Molekül).

b) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -D-mannopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

35

ERSATZBLATT (REGEL 26)

1,1 g (0,067 mmol; entsprechend 1,21 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 7a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,30 g (1,22 mmol) Gadoliniumchlorid, eingesetzt in Form einer wässrigen Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefrier-

5 trocknung erhält man 1,18 g (98,6 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.

Wassergehalt: 3,98 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

10 ber.: C 41,33 H 6,06 N 10,14 S 2,50 Gd 15,76 Na 2,30
 gef.: C 41,27 H 6,10 N 10,21 S 2,54 Gd 15,83 Na 2,36

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 56 % Gd-DPTA und

15 44 % α -D-Mannose (entsprechend 18 Gd-DTPA-Einheiten und 14-D-Mannoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

20

Beispiel 8

32er-DSM-Polyamin(Gd-DTPA-Amid)₁₈ - [1-(4-Thioureidophenyl)- β -D-glucopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

25

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)- β -D-glucopyranosyl]₁₄- Konjugat [als Natrium-Salz]

In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von

30 1,2 g (0,10 mmol; entsprechend 1,4 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 6a) mit 1,92 g (6,03 mmol) p-Isothiocyanatophenyl- β -D-glucopyranose nach Aufarbeitung 1,50 g (91,6 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff.

35 Wassergehalt: 6,49 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 45,34	H 6,65	N 11,12	S 2,74	Na 10,11
gef.:	C 44,98	H 6,60	N 11,19	S 2,70	Na 10,19

Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 44 % β -D-Glucose (entsprechend 14 β -D-Glucoseresten pro Molekül).

10

b) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- β -D-glucopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

15

1,40 g (0,085 mmol; entsprechend 1,54 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 8a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,38 g (1,56 mmol) einer wässrigen Gadoliniumchloridlösung komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung erhält man 1,50 g (98,4 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.

Wassergehalt: 7,33 %

20

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,33	H 6,06	N 10,14	S 2,50	Gd 15,76	Na 2,30
gef.:	C 41,22	H 6,10	N 10,22	S 2,48	Gd 15,71	Na 2,28

25

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 56 % Gd-DTPA und 44 % β -D-Glucose (entsprechend 18 Gd-DTPA-Einheiten und 14 β -D-Glucoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

30

Beispiel 9

35

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -L-fucopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₈- [1-(4-Thioureidophenyl)- α -L-fucopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von
 5 1,0 g (0,083 mmol; entsprechend 1,17 mmol an freien Aminfunktionen) der
 Titelverbindung aus Beispiel 6a) mit 1,50 g (5,03 mmol) p-
 Isothiocyanatophenyl- α -L-fucopyranose nach Aufarbeitung 1,25 g (93,6 % d.
 Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen
 Feststoff.

10 Wassergehalt: 6,74 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 45,97	H 6,74	N 11,28	S 2,78	Na 10,25
gef.:	C 46,03	H 6,81	N 11,32	S 2,75	Na 10,19

15

Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das
 polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen
 Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein
 Beladungsgrad des Polymers mit 44 % α -L-Fucose (entsprechend 14 α -L-
 20 Fucoseresten pro Molekül).

b) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -L-fucopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

25

1,1 g (0,068 mmol; entsprechend 1,22 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus
 Beispiel 9a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,31 g
 (1,24 mmol) Gadoliniumchlorid , eingesetzt in Form einer wässrigen
 Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung
 30 erhält man 1,19 g (98,6 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.
 Wassergehalt: 7,23 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 41,85	H 6,14	N 10,27	S 2,53	Gd 15,96	Na 2,33
35 gef.:	C 41,81	H 6,08	N 10,21	S 2,50	Gd 16,00	Na 2,34

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 56 % Gd-DTPA und 44 % α -L-Fucose (entsprechend 18 Gd-DTPA-Einheiten und 14 α -L-Fucoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen
 5 Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

Beispiel 10

10 32er-DSM-Polyamin(Gd-DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)-N-acetyl- β -D-glucosaminopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₈-[1-(4-Thioureidophenyl)-N-acetyl- β -D-glucopyranosyl]₁₄- Konjugat [als Natrium-Salz]

15

In analoger Weise wie für Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von 1,4 g (0,11 mmol; entsprechend 1,63 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 6a) mit 2,50 g (7,04 mmol) 2-[Acetylamino-2-deoxy]-1-[4-(isothiocyanatophenyl)]- β -D-glucosaminopyranose [Darstellung :
 20 Jonas, A.J. et. al., Biochem. J. (1990) 268, 1] nach Aufarbeitung 1,25 g (93,6 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff.

Wassergehalt: 7,33 %

25 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 44,11	H 6,43	N 15,13	S 2,55	Na 9,41
gef.:	C 44,08	H 6,22	N 15,11	S 2,58	Na 9,38

Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. das
 30 polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 44 % N-Acetyl-D-Glucosamin (entsprechend 14 N-Acetyl- β -D-Glucosaminresten pro Molekül).

35

b) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈ -[1-(4-Thioureidophenyl)-N-acetyl- β -D- glucosaminopyranosyl]₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

- 1,6 g (0,09 mmol; entsprechend 1,64 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 10a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,42 g (1,66 mmol) Gadoliniumchlorid, eingesetzt in Form einer wässrigen
- 5 Gadoliniumchloridlösung, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefrier-trocknung erhält man 1,70 g (98,7 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.

Wassergehalt: 5,51 %

- 10 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 40,45	H 5,90	N 13,88	S 2,34	Gd 14,76	Na 2,16
gef.:	C 40,36	H 5,87	N 13,94	S 2,34	Gd 14,81	Na 2,20

- Aus den molaren Elementarverhältnissen von Gadolinium zu Schwefel ergibt
- 15 sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 56 % Gd-DPTA und 44 % N-Acetyl- β -D-Glucosamin (entsprechend 18 Gd-DTPA-Einheiten und 14-N-Acetyl- β -D-Glucosaminresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels der quantitativen Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

20

Beispiel 11

- 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(α -D-mannopyranosyl-1-thio-
- 25 3- propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

a) N-(2-Brompropionyl)-glycinbenzylester

- Zu 100 g (296,4 mmol) Glycinbenzylester p-Toluolsulfonsäuresalz und 89,98 g
- 30 (889,2 mmol) Triethylamin, gelöst in 500 ml Methylenchlorid, tropft man bei 0°C langsam 60,97 g (355,7 mmol) α -Brom-propionylchlorid zu. Dabei hält man die Temperatur zwischen 0°C - 5°C. Man gibt 1000 ml 5 %ige aqu. Salzsäure hinzu und trennt die organische Phase ab. Die organische Phase wird noch einmal mit 500 ml 5 %iger aqu. Salzsäure gewaschen, über Magnesiumsulfat
- 35 getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird aus Di-isopropylether umkristallisiert.
- Ausbeute: 69,39 g (78 % d. Th.)

Elementaranalyse:

ber.:	C 48,02	H 4,70	N 4,67	Br 26,62
gef.:	C 47,91	H 4,82	N 4,51	Br 26,47

5

b) 1-[1-Benzoyloxycarbonylmethylcarbamoyl]-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan

- 10 Zu 86,14 g (500 mmol) 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan, gelöst in 1000 ml Chloroform, gibt man 50 g (166,6 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 11a) und rührt 24 Stunden bei Raumtemperatur. Man wäscht 3 mal mit 600 ml Wasser, trocknet die organische Phase über Magnesiumsulfat und dampft im Vakuum zur Trockne ein.
- 15 Ausbeute: 53,48 g (82 % d. Th.) eines leicht gelb gefärbten Öls
Wassergehalt: 1,5 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 61,36	H 8,50	N 17,89
20 gef.:	C 62,03	H 8,75	N 17,36

c) 10-[1-Benzoyloxycarbonylmethylcarbamoyl]-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure-tri-tert-butylester, Natriumbromid

25

- Zu 50 g (127,7 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 11b) und 54,14 g (510,8 mmol) Natriumcarbonat in 500 ml Acetonitril tropft man bei Raumtemperatur 82,20 g (421,4 mmol) Bromessigsäure-tert.-butylester und rührt 12 Stunden bei 60°C. Man kühlt auf 0°C und filtriert von den Salzen ab. Das Filtrat wird zur
- 30 Trockne eingedampft und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Methylenchlorid/Methanol= 20:1).
Ausbeute: 90,83 g (85 % d. Th.) eines farblosen Feststoffes

Elementaranalyse:

35 ber.:	C 54,54	H 7,59	N 8,37	Na 2,75	Br 9,55
gef.:	C 54,37	H 7,71	N 8,21	Na 2,83	Br 9,69

d) 10-[1-Carboxymethylcarbamoyl)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure-tri-tert-butylester, Natriumbromid

- 5 90 g (107,5 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 11c) löst man in 1000 ml Isopropanol und gibt 5 g Palladiumkatalysator (10 % Pd/C) zu. Man hydriert über Nacht bei Raumtemperatur. Es wird vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird aus Dioxan umkristallisiert. Ausbeute: 77,06 g (96 % d. Th.) eines kristallinen Feststoffes

10

Elementaranalyse:

ber.:	C 49,86	H 7,69	N 9,38	Na 3,08	Br 10,70
gef.:	C 49,73	H 7,79	N 9,21	Na 3,19	Br 10,83

15

e) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA-tri-t.-butylester-Amid)₂₈-Konjugat

- 20,0 g (26,8 mmol) Gly-Me-DOTA-tri-tert.butylester (Titelverbindung der Beispiele 11d) werden bei Raumtemperatur in 100 ml absolutem
- 20 Dimethylformamid gelöst und unter Rühren mit 3,7 g (32,16 mmol) N-Hydroxysuccinimid versetzt. Anschließend wird das klare Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt und bei dieser Temperatur portionsweise mit insgesamt 6,6 g (32,16 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei 0°C und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur wird vom ausge-
- 25 fallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das so erhaltene Filtrat tropft man nun langsam bei Raumtemperatur zu einer gerührten Lösung von 5,0 g (0,7 mmol; entsprechend 44,8 mmol an freien Aminofunktionen) 64er-DSM-Polyamin und 4,5 g (44,8 mmol) Triethylamin in 40 ml absolutem DMF. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur
- 30 Trockne eingengt und der verbleibende Rückstand mit 200 ml Dichlormethan versetzt. Nach dem Abfiltrieren von unlöslichen Anteilen wird die organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie zweimal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Produktphase über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Man
- 35 erhält 13,03 g (82,4 % d. Th.; bezogen auf eingesetztes Polyamin) eines leicht gelb gefärbten Öls, welches ohne weitere Reinigung unverzüglich für die nachfolgenden Syntheseschritte eingesetzt wird. Nach quantitativer

Ninhydrinreaktion der oben genannten Titelverbindung liegen im Mittel 35,8 freie Aminfunktionen pro Molekül vor.

Elementaranalyse:

5	ber.:	C 65,29	H 10,65	N 16,12
	gef.:	C 64,95	H 10,58	N 16,22

- 10 f) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA-tri-tert.butylester-Amid)₂₈-(3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl)-1-thio- α -D-mannopyranosyl-3-propion-Amid)₃₆-Konjugat

Eine gerührte Lösung von 3,0 g (0,132 mmol; entsprechend 4,8 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 12a), gelöst in 100 ml absolutem Dichlormethan wird bei Raumtemperatur mit 587 mg (5,8 mmol) 15 Triethylamin versetzt. Anschließend wird mit einer Lösung von 2,8 g (5,28 mmol) 3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (Darstellung gemäß: J. Haensler et al., Bioconjugate Chem. 4, 85, (1993); Chipowsky, S., and Lee, Y.C (1973), Synthesis of 1-thio-aldosides; Carbohydrate Research 31, 339-346) in 60 ml Dichlormethan 20 tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Die organische Phase wird nacheinander zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im 25 Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Man erhält 4,60 g (92,6 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl. Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Amino-funktionen mehr nachweisbar.

30 Elementaranalyse:

ber.:	C 58,69	H 8,51	N 8,51	S 3,07
gef.:	C 58,73	H 8,60	N 8,60	S 3,10

Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung 35 ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers mit 56,7 % α -D-Mannosetetraacetat (entsprechend 36 α -D-Mannoseresten pro Molekül).

g) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA -Amid)₂₈-(α -D-mannopyranosyl-1-thio-3-propion-Amid)₃₆-Konjugat

- 5 4,0 g (0,10 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 12b) werden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend wird bei 0°C mit insgesamt 75 ml Trifluoressigsäure tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird mit 100 ml Wasser versetzt und erneut im
- 10 Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 32 %igen wässrigen Ammoniaklösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige
- 15 Produktlösung wird zweimal mit jeweils 60 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Produktlösung wird durch Versetzen mit 10 %iger aqu. Salzsäure auf pH 3,0 gebracht mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt und dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird mit entionisiertem
- 20 Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und gefriergetrocknet. Ausbeute: 2,2 g (76,8 % d. Th.) als amorphes Pulver
Wassergehalt: 7,37 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

25	ber.:	C 50,68	H 7,76	N 13,12	S 4,01
	gef.:	C 50,42	H 7,91	N 13,30	S 4,11

- 30 h) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(α -D-mannopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

- 2,0 g (0,07 mmol; entsprechend 1,94 mmol an Gly-Me-DOTA) der Titelverbindung aus Beispiel 12c) werden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung wird durch tropfenweise Zugabe mit 10 %iger
- 35 wässriger Salzsäure auf 2,0 eingestellt. Anschließend gibt man bei Raumtemperatur 0,52 g (1,98 mmol) Gadoliniumchlorid hinzu und rührt die

Reaktionslösung für 12 Stunden bei 60°C. Bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2 gebracht und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt. Nach dreimaliger Ultrafiltration gegen destilliertes Wasser über eine
 5 YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand gefriergetrocknet. Man erhält 2,27 g (98,2 % d.Th. ; bezogen auf eingesetztes Polyamin) der Titelverbindung als amorphes, farbloses Pulver mit einem Wassergehalt von 6,39 %.

10 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 44,08	H 6,50	N 11,41	S 3,48	Gd 13,29
gef.:	C 44,15	H 6,61	N 11,37	S 3,54	Gd 13,35

Aus den molaren Elementverhältnissen von Schwefel zu Gadolinium (1,30)
 15 ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 43,7 % Gd-Gly-Me-DOTA und 56,3 % α -D-Mannose (entsprechend 28 Gd-Gly-Me-DOTA-Einheiten und 36 α -D-Mannoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels quantitativer Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

20

Beispiel 12

64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(α -L-fucopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat
 25

a) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA-tri-tert.butylester-Amid)₂₈-[(3-(2,3,4,6-Tri-O-acetyl)-1-thio- α -L-fucopyranosyl)-3-propion-Amid)₃₆-Konjugat

30 Eine gerührte Lösung von 2,5 g (0,11 mmol; entsprechend 3,96 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 11e) in 80 ml absolutem Dichlormethan wird bei Raumtemperatur mit 486 mg (4,8 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wird mit einer Lösung von 2,0 g (4,35 mmol) 3-(2,3,4,6-Tri-O-acetyl-1-thio- α -L-fucopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester
 35 (Darstellung in Analogie zu : J. Haensler et al., Bioconjugate Chem. 4, 85, (1993); Chipowsky, S., and Lee, Y.C (1973) , Synthesis of 1-thio-aldosides; Carbohydrate Research 31, 339-346) in 60 ml Dichlormethan tropfenweise

versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Die organische Phase wird nacheinander zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat
5 getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Man erhält 3,32 g (85,1 % d. Th.;bezogen auf eingesetztes Polyamin) der Titelverbindung als farbloses Öl. Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

10

Elementaranalyse:

ber.: C 59.71 H 8,81 N 10.24 S 3.23

gef.: C 59.09 H 8,60 N 9.98 S 3,17

15

b) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA -Amid)₂₈-(α-L-fucopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

4.0 g (0,112 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 12a) werden in 80 ml
20 absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend wird bei 0°C mit insgesamt 60 ml Trifluoressigsäure tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird mit 80 ml Wasser versetzt und erneut im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst und
25 bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 32 %igen wässrigen Ammoniaklösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige Produktlösung wird zweimal mit jeweils 60 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Produktlösung wird durch
30 Versetzen mit 10 %iger aqu. Salzsäure auf pH 3,0 gebracht mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt und dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und gefriergetrocknet.

35 Ausbeute: 2,37 g (76,2 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung
farbloses und amorphes Pulver
Wassergehalt: 7.43 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 52.79 H 8,09 N 13,67 S 4,17

gef.: C 52.66 H 7,99 N 13,40 S 4,14

5

c) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(α -L-fucopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

2.0 g (0,072 mmol; entsprechend 2.02 mmol an Gly-Me-DOTA) der
10 Titelverbindung aus Beispiel 12b) werden in 40 ml destilliertem Wasser gelöst
und der pH-Wert der Lösung wird durch tropfenweise Zugabe mit 10 %iger
wässrigen Salzsäure auf 2,0 eingestellt. Anschließend gibt man bei
Raumtemperatur 534 mg (2.04 mmol) Gadoliniumchlorid hinzu und rührt die
Reaktionslösung für 12 Stunden bei 60°C. Bei Raumtemperatur wird die
15 Reaktionslösung durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2
gebracht und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml
aufgefüllt. Nach dreimaliger Ultrafiltration gegen destilliertes Wasser über eine
YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand
gefriergetrocknet. Man erhält 2,26 g (98,1 % d.Th. ; bezogen auf eingesetztes
20 Polyamin) der Titelverbindung als amorphes, farbloses Pulver mit einem
Wassergehalt von 9.09 %.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 45.57 H 6,72 N 11,80 S 3,80 Gd 13,74

25 gef.: C 45.68 H 6,86 N 11,08 S 3,59 Gd 13,56

Aus den molaren Elementverhältnissen von Schwefel zu Gadolinium (1,32)
ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 43,8 % Gd-Gly-Me-
DOTA und 56,2 % α -L-Fucose (entsprechend 28 Gd-Gly-Me-DOTA-Einheiten
30 und 36 α -L-Fucoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels
quantitativer Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr
nachweisbar.

Beispiel 13

64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(β -D-glucopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

5

a) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA-tri-tert.butylester-Amid)₂₈-[(3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl)-1-thio- β -D-glucopyranosyl-3-propion-Amid)₃₆-Konjugat

10 Eine gerührte Lösung von 2,5 g (0,11 mmol; entsprechend 3,96 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 11e) in 80 ml absolutem Dichlormethan wird bei Raumtemperatur mit 486 mg (4,8 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wird mit einer Lösung von 2,31 g (4,35 mmol) 3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimid-
15 ester (Darstellung in Analogie zu: J. Haensler et al., Bioconjugate Chem. 4, 85, (1993); Chipowsky, S., and Lee, Y.C (1973), Synthesis of 1-thio-aldosides; Carbohydrate Research 31, 339-346) in 60 ml Dichlormethan tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Die organische Phase wird nacheinander zweimal mit Wasser und zweimal mit
20 gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Man erhält 3,70 g (89,4 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl. Die quantitative Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

25

Elementaranalyse:

ber.:	C 58,69	H 8,51	N 9,67	S 3,07
gef.:	C 58,60	H 8,42	N 9,88	S 3,14

30

b) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA -Amid)₂₈-(β -D-glucopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

35 3,5 g (0,087 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 13a) werden in 80 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend wird bei 0°C mit insgesamt 60 ml Trifluoressigsäure tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der

- verbleibende Rückstand wird mit 80 ml Wasser versetzt und erneut im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 32 %igen wässrigen Ammoniaklösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im
- 5 Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige Produktlösung wird zweimal mit jeweils 60 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Produktlösung wird durch Versetzen mit 10 %iger aqu. Salzsäure auf pH 3,0 gebracht mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt und dreimal mittels einer YM3-
- 10 Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1,97 g (78,8 % d. Th.) als amorphes Pulver

Wassergehalt: 5,45 %

15

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 50,68 H 7,76 N 13,12 S 4,01

gef.: C 50,48 H 7,89 N 13,42 S 4,14

20

c) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(β -D-glucopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

- 25 1,5 g (0,052 mmol; entsprechend 1,47 mmol an Gly-Me-DOTA) der Titelverbindung aus Beispiel 13b) werden in 40 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung wird durch tropfenweise Zugabe mit 10 %iger wässrigen Salzsäure auf 2,0 eingestellt. Anschließend gibt man bei Raumtemperatur 393 mg (1,50 mmol) Gadoliniumchlorid hinzu und rührt die
- 30 Reaktionslösung für 12 Stunden bei 60°C. Bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2 gebracht und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Nach dreimaliger Ultrafiltration gegen destilliertes Wasser über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand
- 35 gefriergetrocknet. Man erhält 1,66 g (96,3 % d.Th.) der Titelverbindung als amorphes, farbloses Pulver mit einem Wassergehalt von 8,47 %.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 44,08	H 6,50	N 11,41	S 3,48	Gd 13,29
gef.:	C 44,18	H 6,59	N 11,52	S 3,55	Gd 13,12

- 5 Aus den molaren Elementverhältnissen von Schwefel zu Gadolinium (1,32) ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 43,4 % Gd-Gly-Me-DOTA und 56,6 % β -D-Glucose (entsprechend 28 Gd-Gly-Me-DOTA-Einheiten und 36 β -D-Glucoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels quantitativer Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr
10 nachweisbar.

Beispiel 14

- 15 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(- β -D-galactopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

- a) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA-tri-tert.butylester-Amid)₂₈-[(3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl)-1-thio- β -D-galactopyranosyl-3-propionsäure-Amid)₃₆-
20 Konjugat

- Eine gerührte Lösung von 3,0 g (0,132 mmol; entsprechend 3,96 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 11e) in 100 ml absolutem Dichlormethan wird bei Raumtemperatur mit 587 mg (5,8 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wird mit einer Lösung von 2,8 g (5,28 mmol) 3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (Darstellung in Analogie zu: J. Haensler et al., Bioconjugate Chem. 4, 85, (1993); Chipowsky, S., and Lee, Y.C (1973), Synthesis of 1-thioaldosides; Carbohydrate Research 31, 339-346) in 60 ml Dichlormethan
25 tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Die organische Phase wird nacheinander zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im
30 Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Man erhält 4,44 g (89,4 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl. Die quantitative Ninhydrinreaktion der
35

Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Amino-funktionen mehr nachweisbar.

Elementaranalyse:

5	ber.:	C 58,69	H 8,51	N 9,67	S 3,07
	gef.:	C 58,58	H 8,62	N 9,80	S 3,02

Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers mit 56,5 % β -D-Galactosetetraacetat (entsprechend 36 β -D-Galactoseresten pro Molekül).

15 b) 64er-DSM-Polyamin-(Gly-Me-DOTA -Amid)₂₈-(β -D-galactopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

4,0 g (0,10 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 14a) werden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend wird bei 0°C mit insgesamt 75 ml Trifluoressigsäure tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende Rückstand wird mit 100 ml Wasser versetzt und erneut im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 32 %igen wässrigen Ammoniaklösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige Produktlösung wird zweimal mit jeweils 60 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Produktlösung wird durch Versetzen mit 10 %iger aqu. Salzsäure auf pH 3,0 gebracht, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt und dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und gefriergetrocknet. Ausbeute: 2,3 g (80,36 % d. Th.) als amorphes Pulver Wassergehalt: 5,44 %

35 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 50,68	H 7,76	N 13,12	S 4,01
gef.:	C 50,91	H 7,90	N 13,10	S 3,98

c) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₂₈-(-β-D-galactopyranosyl-1-thio-3-propionsäure-Amid)₃₆-Konjugat

- 5 2,0 g (0,07 mmol; entsprechend 1,94 mmol an Gly-Me-DOTA) der Titelverbindung aus Beispiel 14b) werden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung wird durch tropfenweise Zugabe mit 10 %iger wässriger Salzsäure auf 2,0 eingestellt. Anschließend gibt man bei Raumtemperatur 520 mg (1,98 mmol) Gadoliniumchlorid hinzu und rührt die
- 10 Reaktionslösung für 12 Stunden bei 60°C. Bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2 gebracht und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgeführt. Nach dreimaliger Ultrafiltration gegen destilliertes Wasser über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand
- 15 gefriergetrocknet. Man erhält 2,20 g (95,3 % d.Th.) der Titelverbindung als amorphes, farbloses Pulver mit einem Wassergehalt von 6,38 %.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 44,08	H 6,50	N 11,41	S 3,48	Gd 13,29
20 gef.:	C 43,86	H 6,39	N 11,48	S 3,65	Gd 13,14

Aus den molaren Elementverhältnissen von Schwefel zu Gadolinium (Verhältnis: 1,36) ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 42,2 % Gd-Gly-Me-DOTA und

- 25 57,8 % β-D-Galactose (entsprechend 27 Gd-Gly-Me-DOTA-Einheiten und 36 β-D-Galactoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind mittels quantitativer Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

30

Beispiel 15

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₄-(α-D-mannopyranosyl-1-thiopropionsäure-amid)₁₈- Konjugat [als Natrium-Salz]

35

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-tetra-tert.butylester-Amid)₁₄

20,0 g (32,37 mmol) 3,9-Bis(t-butoxycarbonylmethyl)-6-carboxymethyl-3,6,9-triazaundecandicarbonsäure-di-t-butylester (Darstellung wie in den europäischen Patenanmeldungen: EP 0430863; EP 0331616 und EP 0271180 beschrieben) werden bei Raumtemperatur in 100 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und unter Rühren mit 4,47 g (38,84 mmol) N-Hydroxysuccinimid versetzt. Anschließend wird das klare Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt und bei dieser Temperatur portionsweise mit insgesamt 7,97 g (38,84 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei 0°C und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das so erhaltene Filtrat tropft man nun langsam bei Raumtemperatur zu einer gerührten Lösung von 6,7 g (1,9 mmol; entsprechend 60,8 mmol an freien Aminofunktionen) 32er-DSM-Polyamin und 6,5 g (64,7 mmol) Triethylamin in 60 ml absolutem DMF. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und der verbleibende Rückstand mit 250 ml Dichlormethan versetzt. Nach dem Abfiltrieren von unlöslichen Anteilen wird die organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Produktphase über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Man erhält 18,1 g (80,4 % d. Th.; bezogen auf eingesetztes Polyamin) eines leicht gelb gefärbten Öls, welches ohne weitere Reinigung unverzüglich für die nachfolgenden Syntheseschritte eingesetzt wird. Nach quantitativer Ninhydrinreaktion der oben genannten Titelverbindung liegen im Mittel 18 freie Aminfunktionen pro Molekül vor.

Elementaranalyse:

ber.:	C 60.01	H 10.04	N 12.22
gef.:	C 60.13	H 9.91	N 12.34

b) 32er-DSM-Polyamin-DTPA-tetra-tert.butylester-amid)₁₄-[(3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)-1-thio- α -D-mannopyranosyl-3-propion-amid)]₁₈

Eine gerührte Lösung von 3,5 g (0,29 mmol; entsprechend 5,3 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 15a) in 100 ml absolutem

Dichlormethan wird bei Raumtemperatur mit 820 mg (8,1 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wird mit einer Lösung von 3,97 g (7,49 mmol) 3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (Lee, Y.C. et al., Biochemi., Vol. 15, No. 18, 1976, 3956-3963; Krohn, K.A. et al., J. Nucl. Med., Vol. 26, 10, 1985, 1157-1167) in 5 60 ml Dichlormethan tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Die organische Phase wird nacheinander zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung 10 gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Man erhält 5,06 g (89,4 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl. Die Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

15

Elementaranalyse:

ber.: C 56.13 H 8.29 N 7.48 S 2,96

gef.: C 56.35 H 8.40 N 7,36 S 2,89

20 Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers mit 56 % D-Mannosetetraacetat (entsprechend 18 D-Mannoseresten pro Molekül).

25 c) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-amid)₁₄-(α -D-mannopyranose-1-thio-propionamid)₁₈-Konjugat [als Natrium-Salz]

5,84 g (0,30 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 15b) werden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend wird bei 0°C mit insgesamt 75 30 ml Trifluoressigsäure tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird mit 100 ml Wasser versetzt und erneut im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 32 %igen wässrigen 35 Ammoniaklösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige

- Produktlösung wird zweimal mit jeweils 60 ml Diethylether extrahiert, anschließend durch Versetzen mit 10%iger aqu. Salzsäure auf pH 3.0 gebracht, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt und dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser
- 5 ultrafiltriert. Nach erneuter Ultrafiltration wird der verbleibende Rückstand mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und gefriergetrocknet. Anschließend wird in 300 ml Wasser aufgenommen und der pH-Wert der resultierenden Produktlösung durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf 7,2 eingestellt.
- 10 Ausbeute: 3,16 g (87,0 % d. Th.) als amorphes und farbloses Pulver.
Wassergehalt: 5,89 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

- | | | | | | |
|----------|---------|--------|--------|----------|--------|
| ber.: | C 42.48 | H 4.48 | N 6.91 | Na 10.59 | S 4,75 |
| 15 gef.: | C 42.22 | H 4.56 | N 7.03 | Na 10.23 | S 4,70 |

Die Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

- 20 d) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-amid)₁₄-(α -D-mannopyranose-1-thio-3-propion-amid)₁₈ [als Natrium-Salz]

- 2,67 g (0,22 mmol; entsprechend 3.08 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus
- 25 Beispiel 15 c) werden in 70 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung wird durch tropfenweiser Zugabe mit 10 %iger wässrigen Salzsäure auf 5,2 eingestellt. Abschließend gibt man bei Raumtemperatur eine Lösung von 815 mg (3,10 mmol) Gadoliniumchlorid, gelöst in 10 ml destilliertem Wasser hinzu und rührt die Reaktionslösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die
- 30 Reaktionslösung wird durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2 gebracht und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Nach dreimaliger Ultrafiltration gegen destilliertes Wasser über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand gefriergetrocknet. Man erhält 2,88 g (98,0 % d.Th.) der Titelverbindung als
- 35 amorphes, farbloses Pulver mit einem Wassergehalt von 7.09 %.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 38.66	H 4.06	N 6.27	S 4.31	Gd 16.44	Na 2.48
gef.:	C 38.78	H 4.14	N 6.12	S 4.49	Gd 16.60	Na 2.38

5 Aus den molaren Elementarverhältnissen von Schwefel zu Gadolinium ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 44 % Gd-DTPA und 56 % α -D-Mannose (entsprechend 14 Gd-DTPA-Einheiten und 18 α -D-Mannoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind durch Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

10

Beispiel 16

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₄-(β -D-glucopyranosyl-1-thiopropionsäure-amid)₁₈- Konjugat [als Natrium-Salz]

15

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-tetra-tert.butylester-Amid)₁₄

10,0 g (16,35 mmol) 3,9-Bis(t-butoxycarbonylmethyl)-6-carboxymethyl-3,6,9-triazaundecandicarbonsäure-di-t-butylester (Darstellung wie in den europäischen Patenanmeldungen: EP 0430863; EP 0331616 und EP 0271180 beschrieben) werden bei Raumtemperatur in 50 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und unter Rühren mit 2,23 g (19,42 mmol) N-Hydroxysuccinimid versetzt. Anschließend wird das klare Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt und bei dieser Temperatur portionsweise mit insgesamt 3.99 g (19,42 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 25 30 Minuten bei 0°C und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das so erhaltene Filtrat tropft man nun langsam bei Raumtemperatur zu einer gerührten Lösung von 3,35 g (0,95 mmol; entsprechend 30,4 mmol an freien Aminofunktionen) 32er-DSM-Polyamin und 3,25 g (32,35 mmol) Triethylamin in 30 ml absolutem DMF. Nach 30 einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und der verbleibende Rückstand mit 150 ml Dichlormethan versetzt. Nach dem Abfiltrieren von unlöslichen Anteilen wird die organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 35 zweimal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Produktphase über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Man erhält 8,87 g (78,8 % d. Th.; bezogen auf eingesetztes

Polyamin) eines leicht gelb gefärbten Öls, welches ohne weitere Reinigung unverzüglich für die nachfolgenden Syntheseschritte eingesetzt wird. Nach quantitativer Ninhydrinreaktion der oben genannten Titelverbindung liegen im Mittel 18 freie Aminfunktionen pro Molekül vor.

5

Elementaranalyse:

ber.: C 60.01 H 10.04 N 12.22

gef.: C 60.20 H 10.12 N 12.38

- 10 b) 32er-DSM-Polyamin-DTPA-tetra-tert.butylester-amid)₁₄-[(3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)-1-thio-β-D-glucopyranosyl-3-propion-amid)₁₈

Eine gerührte Lösung von 3,5 g (0,29 mmol; entsprechend 5,3 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 16a) in 100 ml absolutem
15 Dichlormethan wird bei Raumtemperatur mit 820 mg (8,1 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wird mit einer Lösung von 3,97 g (7,49 mmol) 3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (Analoge Darstellung wie beschrieben in: Lee, Y.C. et al., Biochemi., Vol. 15, No. 18, 1976, 3956-3963; Krohn, K.A. et al., J. Nucl.
20 Med., Vol. 26, 10, 1985, 1157-1167 ; J. Haensler et al., Bioconjugate Chem. 4, 85, (1993); Chipowsky, S., and Lee, Y.C (1973) , Synthesis of 1-thio-aldosides; Carbohydrate Research 31, 339-346) in 60 ml Dichlormethan tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Die
25 organische Phase wird nacheinander zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Man erhält 4,94 g (87,3 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl. Die Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h.
30 im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

Elementaranalyse:

ber.: C 56.13 H 8.29 N 7.48 S 2,96

gef.: C 56.04 H 8.33 N 7,40 S 2,90

35

Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers mit 56 % β -D-Glucosetetraacetat (entsprechend 18 β -D-Glucoseresten pro Molekül).

5

c) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-amid)₁₄-(β -D-Glucopyranose-1-thio-propionamid)₁₈-Konjugat [als Natrium-Salz]

5,84 g (0,30 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 16b) werden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend wird bei 0°C mit insgesamt 75 ml Trifluoressigsäure tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird mit 100 ml Wasser versetzt und erneut im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 32 %igen wässrigen Ammoniaklösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige Produktlösung wird zweimal mit jeweils 60 ml Diethylether extrahiert, anschließend durch Versetzen mit 10 %iger aqu. Salzsäure auf pH 3.0 gebracht, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt und dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Nach erneuter Ultrafiltration wird der verbleibende Rückstand mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und gefriergetrocknet. Anschließend wird in 300 ml Wasser aufgenommen und der pH-Wert der resultierenden Produktlösung durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf 7,2 eingestellt.

Ausbeute: 3,16 g (87,0 % d. Th.) als amorphes und farbloses Pulver.

Wassergehalt: 5,89 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 42.48	H 4.48	N 6.91	Na 10.59	S 4,75
gef.:	C 42.36	H 4.50	N 6.98	Na 10.41	S 4,78

35

Die Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

d) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-amid)₁₄-(β-D-glucopyranose-1-thio-3-propion-amid)₁₈ [als Natrium-Salz]

5

2,67 g (0,22 mmol; entsprechend 3.08 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 16 c) werden in 70 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung wird durch tropfenweiser Zugabe mit 10 %iger wässrigen Salzsäure auf 5,2 eingestellt. Anschließend gibt man bei Raumtemperatur eine Lösung von 815 mg (3,10 mmol) Gadoliniumchlorid in 10 ml destilliertem Wasser hinzu und rührt die Reaktionslösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2 gebracht und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Nach dreimaliger Ultrafiltration gegen destilliertes Wasser über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand gefriergetrocknet. Man erhält 2,79 g (95,0 % d.Th.) der Titelverbindung als amorphes, farblores Pulver mit einem Wassergehalt von 8,96 %.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 38.66	H 4.06	N 6.27	S 4.31	Gd 16.44	Na 2.48
gef.:	C 38.60	H 4.06	N 6.22	S 4,21	Gd 16.54	Na 2.34

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Schwefel zu Gadolinium ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 44 % Gd-DTPA und 56 % β-D-Glucose (entsprechend 14 Gd-DTPA-Einheiten und 18 β-D-Glucoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind durch Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

30 Beispiel 17

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₃-(α-D-mannopyranose-1-thio-3-propion-Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

35 a) 32er DSM-Polyamin-(DTPA-tetra-t.-butylester-Amid)₁₃-Konjugat

25,0 g (40,46 mmol) 3,9-Bis(t-butoxycarbonylmethyl)-3-carboxymethyl-3,6,9-triazaundecandicarbonsäure-di-t-butylester (Darstellung wie in den europäischen Patenanmeldungen: EP 0430863; EP 0331616 und EP 0271180 beschrieben) werden bei Raumtemperatur in 100 ml absolutem Dimethyl-
5 formamid gelöst und unter Rühren mit 5,58 g (48,50 mmol) N-Hydroxy-succinimid versetzt. Anschließend wird das klare Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt und bei dieser Temperatur portionsweise mit insgesamt 10,0 g (48,50 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei 0°C und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur wird vom ausge-
10 fallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das so erhaltene Filtrat tropft man nun langsam bei Raumtemperatur zu einer gerührten Lösung von 9,0 g (2,56 mmol; entsprechend 82,0 mmol an freien Aminofunktionen) 32er - DSM-Polyamin und 8,2 g (82,0 mmol) Triethylamin in 100 ml absolutem DMF. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur
15 Trockne eingeeengt und der verbleibende Rückstand mit 300 ml Dichlormethan versetzt. Nach dem Abfiltrieren von unlöslichen Anteilen wird die organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Produktphase über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Man
20 erhält 25,1 g (86,7 % d. Th.; bezogen auf eingesetztes Polyamin) eines leicht gelb gefärbten Öls, welches ohne weitere Reinigung unverzüglich für die nachfolgenden Syntheseschritte eingesetzt wird. Nach quantitativer Ninhydrinreaktion der oben genannten Titelverbindung liegen im Mittel 19 freie Aminfunktionen pro Molekül vor.

25

Elementaranalyse:

ber.: C 60.95 H 9.99 N 12.51

gef.: C 61.04 H 10.06 N 12.58

30

b) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA- tetra-tert.butylester -Amid)₁₃-[(3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)-1-thio-α-D-mannopyranosyl- 3-propion-Amid)₁₉-Konjugat

35 Eine gerührte Lösung von 4.0 g (0,35 mmol; entsprechend 6.72 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 17a) in 100 ml absolutem Dichlormethan wird bei Raumtemperatur mit 815 mg (8,0 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wird mit einer Lösung von 3,91 g (7,4 mmol) 3-(2,3,4,6-

Tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (Lee, Y.C. et al., Biochemi., Vol. 15, No. 18, 1976, 3956-3963; Krohn, K.A. et al., J. Nucl. Med., Vol. 26, 10, 1985, 1157-1167) in 100 ml Dichlormethan tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt. Die organische Phase wird nacheinander zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Man erhält 5,82 g (86,4 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl. Die Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

Elementaranalyse:

ber.:	C 55.94	H 8.05	N 7.34	S 3.16
gef.:	C 5,02	H 8.13	N 7.29	S 3.14

Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers mit 58 % α -D-Mannosetetraacetat (entsprechend 19 α -D-Mannoseresten pro Molekül).

c) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₃-(α -D-mannopyranose-1-thio-3-propion-Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

5,0 g (0,26 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 17b) werden in 120 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend wird bei 0°C mit insgesamt 85 ml Trifluoressigsäure tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird mit 125 ml Wasser versetzt und erneut im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 32 %igen wässrigen Ammoniaklösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird im Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die wässrige Produktlösung wird zweimal mit jeweils 80 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Produktlösung wird anschließend durch Versetzen mit 10 %iger aqu. Salzsäure

auf pH 3.0 gebracht, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 ml aufgefüllt und dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Nach erneuter Ultrafiltration wird der verbleibende Rückstand mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml
5 aufgefüllt und gefriergetrocknet. Anschließend wird in 300 ml Wasser aufgenommen und der pH-Wert der resultierenden Produktlösung durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf 7,2 eingestellt.
Ausbeute: 2,78 g (84,7 % d. Th.) als amorphes und farbloses Pulver.
Wassergehalt: 8.94 %

10

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 46.78	H 6.72	N 6.60	S 4.08	Na 8.67
gef.:	C 46.59	H 6.88	N 6.39	S 4.33	Na 8.81

15 Die Ninhydrinreaktion der Titelverbindung verläuft negativ, d. h. im Polymer sind keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

20 d) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₃-(α -D-mannopyranose-1-thio-3-propion-Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

2,5 g (0,19 mmol; entsprechend 2,57 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 17c) werden in 70 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung wird durch tropfenweise Zugabe mit 10 %iger wässrigen Salzsäure auf
25 5,2 eingestellt. Anschließend gibt man bei Raumtemperatur eine Lösung von 683 mg (2,60 mmol) Gadoliniumchlorid in 10 ml destilliertem Wasser hinzu und rührt die Reaktionslösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird durch Versetzen mit 1 molarer Natronlauge auf pH 7,2 gebracht und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml
30 aufgefüllt. Nach dreimaliger Ultrafiltration gegen destilliertes Wasser über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (Amicon) wird der verbleibende Rückstand gefriergetrocknet. Man erhält 2.80 g (98,3 % d.Th.) der Titelverbindung als amorphes, farbloses Pulver mit einem Wassergehalt von 6,72 %.

35 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 43.15	H 6.28	N 6.09	S 4.08	Gd 13.68	Na 1.98
gef.:	C 43.22	H 6.34	N 6.14	S 4.17	Gd 13.72	Na 2.05

Aus den molaren Elementarverhältnissen von Schwefel zu Gadolinium ergibt sich somit ein mittlerer Beladungsgrad des Polymers von 42% Gd-DTPA und 58 % α -D-Mannose (entsprechend 13 Gd-DTPA-Einheiten und 19 α -D-Mannoseresten pro Molekül). In der Titelverbindung sind durch Ninhydrinreaktion keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

Beispiel 18

10

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₃-(β -D-galactopyranose-1-thio-3-propion-Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

15

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA- tetra-tert.butylester -Amid)₁₃-[(3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl)-1-thio- β -D-galactopyranosyl- 3-propion-Amid)₁₉-Konjugat

20

Auf analoge Weise wie für Beispiel 17b) beschrieben, führt die Umsetzung von 5,0 g (0,44 mmol; entsprechend 8,4 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 17a) mit 4,88 g (9,23 mmol) 3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (Darstellung gemäß: Lee, Y.C. et al., Biochemi., Vol. 15, No. 18, 1976, 3956-3963; Krohn, K.A. et al., J. Nucl. Med., Vol. 26, 10, 1985, 1157-1167) zur Bildung von 7,48 g (88,3 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Öl.

25

Elementaranalyse:

ber.:	C 55,94	H 8.05	N 7.34	S 3.16
gef.:	C 56,02	H 8.11	N 7.38	S 3.20

30

Die Titelverbindung zeigt eine negative Ninhydrinreaktion. Aus dem prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse ergibt sich ein mittlerer Belastungsgrad des Polymers mit 19 β -D-Galactoseresten pro Molekül.

35

b) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₃-(β -D-galactopyranose-1-thio-3-propion-Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

Auf analoge Weise wie für Beispiel 17c) beschrieben, führt die Abspaltung der Schutzgruppen von 7.0 g (0,36 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 18a) nach Gefriertrocknung zur Bildung von 3,93 g (86,3 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als amorphes Pulver.

5

Wassergehalt: 4,58 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 46.78	H 6.72	N 6.60	S 4.08	Na 8.67
gef.:	C 46.83	H 6.90	N 6.54	S 3.98	Na 8.87

10

c) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₃-(β -D-galactopyranose-1-thio-3-propion- Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

15 Auf analoge Weise wie für Beispiel 17d) beschrieben, führt die Komplexierung von 3.5 g (0,27 mmol; entsprechend 3,60 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 18b) mit 956mg (3,64 mmol) Gadoliniumchlorid zur Bildung der oben genannten Titelverbindung.

Ausbeute: 3,92 g (97,3 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses und

20 amorphes Pulver

Wassergehalt: 7,33 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 43.15	H 6.28	N 6.09	S 4.08	Gd 13.68	Na 1.98
25 gef.:	C 43.20	H 6.38	N 6.14	S 4.13	Gd 13.75	Na 2.05

Mittlerer Beladungsgrad pro Molekül der oben genannten Titelverbindung:

13 Gd-DTPA-Einheiten und

19 β -D-Galactopyranoseeinheiten .

30

Beispiel 19

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₃-(β -D- glucopyranose-1-thio- 3-propion-Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

5

a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA- tetra-tert.butylester -Amid)₁₃-[(3-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl)-1-thio- β -D- glucopyranosyl- 3-propion-Amid)₁₉-Konjugat

Auf analoge Weise wie für Beispiel 17b) beschrieben, führt die Umsetzung von
 10 6,0 g (0,53 mmol; entsprechend 10,03 mmol an freien Aminfunktionen) der
 Titelverbindung aus Beispiel 17a) mit 5,83 g (11,03 mmol) 3-(2,3,4,6-Tetra-O-
 acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester
 (Darstellung gemäß: Lee, Y.C. et al., Biochemi., Vol. 15, No. 18, 1976, 3956-
 3963; Krohn, K.A. et al., J. Nucl. Med., Vol. 26, 10, 1985, 1157-1167) zur
 15 Bildung von 8,70 g (85,6 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als
 farbloses Öl.

Elementaranalyse:

ber.:	C 55,94	H 8.05	N 7.34	S 3.16
20 gef.:	C 55.96	H 8.00	N 7.32	S 3.14

Die Titelverbindung zeigt eine negative Ninhydrinreaktion. Aus dem
 prozentualen Schwefelwert der Elementaranalyse ergibt sich ein mittlerer
 Belastungsgrad des Polymers mit 19 β -D-Glucoseresten pro Molekül.

25

b) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₃-(β -D-glucopyranose-1-thio-3-propion-
 Amid)₁₉-Konjugat [als Natrium-Salz]

30 Auf analoge Weise wie für Beispiel 17c) beschrieben, führt die Abspaltung der
 Schutzgruppen von 8.0 g (0,41 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 19a)
 nach Gefriertrocknung zur Bildung von 4,54 g (87,6 % d. Th.) der oben
 genannten Titelverbindung als amorphes Pulver.

35 Wassergehalt: 3,97 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 46.78	H 6.72	N 6.60	S 4.08	Na 8.67
-------	---------	--------	--------	--------	---------

gef.: C 46.70 H 6.91 N 6.33 S 4.25 Na 8.66

- 5 c) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₃-(β -D-glucopyranose-1-thio-3-propion-Amid)₁₉-Konjugat

Auf analoge Weise wie für Beispiel 17d) beschrieben, führt die Komplexierung von 4,0 g (0,31 mmol; entsprechend 4,11 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 19b) mit 1100 mg (4,20 mmol) Gadoliniumchlorid zur Bildung der oben genannten Titelverbindung.

Ausbeute: 4,55 g (96,3 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses und amorphes Pulver

Wassergehalt: 6.82 %

- 15 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 43.15 H 6.28 N 6.09 Na 2.00 S 4.08 Gd 13.68

gef.: C 43.20 H 6.36 N 6.14 Na 2.04 S 4.12 Gd 13.72

Mittlerer Beladungsgrad pro Molekül der oben genannten Titelverbindung:

- 20 13 Gd-DTPA-Einheiten und
19 β -D-Glucopyranoseeinheiten .

Beispiel 20

25

32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈-(O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucono-1,5-lacton-Amid)₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

- a) 32er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₁₈-(O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucono-1,5-lacton-Amid)₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]
- 30

1,0 g (0,0835 mmol; entsprechend 1,17 mmol an freien Aminofunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 6a) werden bei Raumtemperatur in 10 ml absolutem Dimethylsulfoxid suspendiert. Anschließend gibt man eine Lösung von 2,60 g (7,25 mmol; O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucono-1,5-lacton [Darstellung nach den in der Literatur beschriebenen Verfahren: (a) Williams, T. et al., (b) Kobayashi, K., Sumitomo, H., Ina, Y., Polym. J. 1985, 17, 567, (c)

35

Hiromi Kitano, Katsuko Sohda, and Ayako Kosaka, Bioconjugate Chem. 1995, 6, 131-134] in 20 ml absolutem Dimethylsulfoxid tropfenweise hinzu und rührt die Reaktionslösung 1 h bei 40°C. Die oben genannte Titelverbindung wird dadurch erhalten, daß die Reaktionslösung bei Raumtemperatur in 250 ml
5 absolutem Methanol unter Rühren eingegossen wird, was zur Bildung der Titelverbindung als farblosen Niederschlag führt. Der so erhaltene Niederschlag wird abgesaugt, gut mit Methanol nachgewaschen und anschließend in 300 ml destilliertem Wasser gelöst und über eine Ultrafiltrationsmembran (YM-3, Amicon) filtriert. Der verbleibende Rückstand wird in Wasser aufgenommen und
10 gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1,22 g (87,2 % d. Th.) als farbloses Lyophilisat.

Wassergehalt: 5,98 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

15	ber.:	C 43,35	H 6,84	N 9,71	Na 9,89
	gef.:	C 43,54	H 6,92	N 9,65	Na 10.01

Nach Elementaranalyse als auch colorimetrischer Titration mit 0,0025 molare Gadoliniumsulfat-Maßlösung, in Gegenwart von Xylenorange als Indikator,
20 ergibt sich ein DTPA-Beladungsgrad des Polymers von 56.8 % (entsprechend 18 DTPA-Einheiten pro Molekül). Nach quantitativer Ninhydrinreaktion sind in der Titelverbindung keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

25 b) 32er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₁₈-(O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-D-glucono-1,5-lacton-Amid)₁₄-Konjugat [als Natrium-Salz]

0,5 g (0,03 mmol; entsprechend 0,54 mmol an DTPA) der Titelverbindung aus Beispiel 20a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 143 mg (
30 0,55 mmol) Gadoliniumoxid, gelöst in 7,5 ml destilliertem Wasser, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung erhält man 0,53 g (98,0 % d. Th.) der Titelverbindung als amorphes Pulver.

Wassergehalt: 7,23 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 39.59 H 6.26 N 8.87 Gd 15.45 Na 2.26

gef.: C 39.66 H 6.18 N 8.97 Gd 15.60 Na 2.30

5

Beispiel 21

64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈-(O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-D-glucono- 1,5-lacton-Amid)₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

10

a) 64er-DSM-Polyamin-(DTPA-Amid)₃₈-(O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-D-glucono-1,5-lacton-Amid)₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

15

1,0 g (0,044 mmol; entsprechend 1,14 mmol an freien Aminofunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 1a) werden bei Raumtemperatur in 10 ml absolutem Dimethylsulfoxid suspendiert. Anschließend gibt man eine Lösung von 2,55 g (7,12 mmol; O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-D-glucono-1,5-lacton [Darstellung nach den in der Literatur beschriebenen Verfahren: (a) Williams, T. et al., (b) Kobayashi, K., Sumitomo, H., Ina, Y., Polym. J. 1985, 17, 567, (c) Hiromi Kitano, Katsuko Sohda, and Ayako Kosaka, Bioconjugate Chem. 1995, 6, 131-134] in 20 ml absolutem Dimethylsulfoxid tropfenweise hinzu und rührt die Reaktionslösung 1 h bei 40°C. Die oben genannte Titelverbindung wird dadurch erhalten, daß die Reaktionslösung bei Raumtemperatur in 250 ml absolutem Methanol unter Rühren eingegossen wird, was zur Bildung der Titelverbindung als farblosen Niederschlag führt. Der so erhaltene Niederschlag wird abgesaugt, gut mit Methanol nachgewaschen und anschließend in 300 ml destilliertem Wasser gelöst und über eine Ultrafiltrationsmembran (YM-3, Amicon) filtriert. Der verbleibende Rückstand wird in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

20

25

30

Ausbeute: 1,32 g (90,4 % d. Th.) als farbloses Lyophilisat.
Wassergehalt: 3,92 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 43,41 H 6,09 N 9,84 Na 10,49

35

gef.: C 43,60 H 6,31 N 9,95 Na 10,70

Nach Elementaranalyse als auch colorimetrischer Titration mit 0,0025 molare Gadoliniumsulfat-Maßlösung, in Gegenwart von Xylenorange als Indikator, ergibt sich ein DTPA-Beladungsgrad des Polymers von 59,8 % (entsprechend 38 DTPA-Einheiten pro Molekül). Nach quantitativer Ninhydrinreaktion sind in der
5 Titelverbindung keine freien Aminofunktionen mehr nachweisbar.

b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA-Amid)₃₈-(O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-D-glucono-1,5-lacton-Amid)₂₆-Konjugat [als Natrium-Salz]

10

1,0 g (0,03 mmol; entsprechend 1,14 mmol an DTPA der Titelverbindung aus Beispiel 21a) werden in Analogie wie für Beispiel 1c) beschrieben mit 0,30 g (1,15 mmol) Gadoliniumoxid, gelöst in 10 ml destilliertem Wasser, komplexiert. Nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung erhält man 1,06 g (96,3 % d. Th.) der
15 Titelverbindung als amorphes Pulver.
Wassergehalt: 7,23 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 39,44	H 5,45	N 8,94	Gd 16,30	Na 2,38
20 gef.:	C 39,53	H 5,53	N 9,02	Gd 16,44	Na 2,41

Beispiel 22

25 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈-[1-O-(4-Thioureido-tetraethylenglycolyl-phenyl)-β-D-galactopyranosyl]₂₆-Konjugat

a) 1-O-[4-Nitrophenyl]-tetraethylenglycol

30 863,2 g (5 mol) Tetraethylenglycol werden in 2,5 l wasserfreien Toluol gelöst und bei Raumtemperatur nacheinander mit 159,4 g (2,5 mol) 88 %igem Kaliumhydroxydpulver und 7,5 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat versetzt. Bei 0°C wird dann unter starkem Rühren eine Lösung von 53 ml (500 mmol) 4-Fluornitrobenzol in 500 ml wasserfreiem Toluol tropfenweise addiert. Nach
35 beendeter Zugabe wird noch 4 Stunden bei 0°C und 12 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch in 2000 ml Eiswasser eingerührt und anschließend wird die Toluolphase abgetrennt und

die wässrige Phase erschöpfend mit Toluol extrahiert. Nach dem Waschen der vereinigten organischen Phasen mit Wasser, wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Den verbleibenden, leicht gelblich gefärbte ölige Rückstand wird
5 säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: Essigester/ Hexan= 3:1). Man erhält 135,8 g (86,1 % d. Th.) eines leicht gelblich gefärbten Öls.

Elementaranalyse:

ber.:	C 53,33	H 6,71	N 4,44
10 gef.:	C 53,27	H 6,68	N 4,50

b) 2,3,4,6-Tetraacetyl- β -D-galactopyranosyl-1-O-[(4-Nitrophenyl)-
15 tetraethylenglycol]

10 g β -D-Galactosepentaacetat (Kommerziell erhältlich; Aldrich) werden in 40 ml absolutem 1,2-Dichlorethan gelöst und mit einer Lösung von 8,0 g (25,6 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 22a) in 15 ml 1,2-Dichlorethan
20 versetzt. Anschließend werden 3,9 ml (33,3 mmol) Zinntetrachlorid bei Raumtemperatur langsam zugetropft und die so erhaltene Reaktionslösung wird 12 h bei Raumtemperatur nachgerührt. Zur Aufarbeitung wird mit Wasser versetzt, die organische Phase abgetrennt und die verbleibende wässrige Phase erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Trocknen der
25 organischen Phasen über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Der verbleibende ölige Rückstand wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Eluent: Dichlormethanol/Methanol= 20:1).
Man erhält 14,6 g (88,2 % d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als
30 farbloses Öl.

Elementaranalyse:

ber.:	C 52,09	H 6,09	N 2,17
35 gef.:	C 52,13	H 6,11	N 2,21

c) β -D-Galactopyranosyl-1-O-[(4-Nitrophenyl)-tetraethylenglycol]

33,93 g (52,56 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 22b) werden in 680 ml absolutem Methanol gelöst und mit 0,8 g (14,8 mmol) Natriummethanolat
5 versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung durch portionsweise Zugabe von IRA-120-(H⁺)-Kationenaustauscher® neutralisiert, vom Austauscher abgesaugt und das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne abgezogen. Die so erhaltene
10 Titelverbindung (23,3 g ; 95,5 % d. Th.) wird ohne weitere Reinigung direkt für den nachfolgenden Reduktionsschritt eingesetzt.

Elementaranalyse:

ber.:	C 50,31	H 6,54	N 2,93
gef.:	C 50,48	H 6,74	N 3,07

15

d) β -D-Galactopyranosyl-1-O-[(4-aminophenyl)-tetraethylenglycol]

Die Reduktion von 14,61 g (30,6 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 22c)
20 erfolgt nach den in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen, [siehe zum Beispiel:

Taylor, J.K. et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun.; 1993, 1410; Goldstein I.J., Methods in Enzymologie, Vol. XXVII, Part B., 212-219, 1972] unter Verwendung von Wasserstoff (1 atm.) als Reduktionsmittel, Palladium (10 %) auf Barium-
25 sulfat als Katalysator und wasserfreiem Methanol als Lösungsmittel. Nach literaturbeschriebener Aufarbeitung erhält man 13,15 g (96 % d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

30 ber.:	C 53.68	H 7.43	N 3.13
gef.:	C 53.43	H 7.60	N 3.20

e) β -D-Galactopyranosyl-1-O-[(4- isothiocyanatophenyl)-tetraethylenglycol]

35 Durch literaturbekannte Umsetzung [vgl.: J.Goldstein, D.H. Buss, J. Chem. Soc. C, (1968), 1457] von 13,24 g (30,0 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 22d) mit insgesamt 5.1 ml Thiophosgen in 850 ml 80 %igem

wässrigem Ethanol, erhält man nach Aufarbeitung 12,62 g (86% d. Th.) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Öl.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

5	ber.:	C 53,26	H 6,60	N 2.96	S 6,77
	gef.:	C 53,13	H 6,69	N 3.04	S 6,84

- 10 f) 10-[1-Carboxymethylcarbamoyl)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure

77 g (103,1 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 11d) werden in 500 ml Trifluoressigsäure gelöst und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man
15 dampft zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in 300 ml Wasser auf und gibt die Lösung auf eine Säule, gefüllt mit Reillex® 425 PVP. Man eluiert mit Wasser. Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und zur Trockne eingedampft, der Rückstand wird aus Methanol/Aceton umkristallisiert. Ausbeute: 44,04 g (84 % d. Th.) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.
20 Wassergehalt: 6,5 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 47,99	H 6,99	N 14,73
gef.:	C 47,83	H 7,12	N 14,55

25

- g) Gadolinium-Komplex der 10-[1-Carboxymethylcarbamoyl)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure

Zu 40 g (84,12 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 22f) , gelöst in 400 ml
30 Wasser, gibt man 15,27 g (42,06 mmol) Gadoliniumoxid und erwärmt 3 h auf 90°C. Man dampft zur Trockne ein (Vakuum) und kristallisiert den Rückstand aus 90 % aqu. Ethanol um. Die Kristalle werden abgesaugt, einmal mit Ethanol, dann mit Aceton und zum Schluß mit Diethylether gewaschen und im Vakuumofen bei 130°C getrocknet (24 Stunden).
35 Ausbeute: 50,53 g (93 % d. Th.) eines farblosen kristallinen Pulvers
Wassergehalt: 2,5 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 36,24	H 4,80	N 11,12	Gd 24,97
gef.:	C 36,35	H 4,95	N 10,98	Gd 24,80

5

h) 64er-DSM-Polyamin(Gd-Gly-Me-DOTA-Amid)₃₈-Konjugat

Eine gerührte Suspension von 5,0 g (7,95 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 22g) in 15 ml absolutem Dimethylsulfoxid wird bei 70°C mit 0,68 g (15,9 mmol) Lithiumchlorid versetzt. Nach 30 Minuten bei 70°C wird die nun klare Reaktionslösung portionsweise mit insgesamt 1,83 g (15,9 mmol) N-Hydroxysuccinimid versetzt und das Reaktionsgemisch noch 1 Stunde bei dieser Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen auf 13°C wird mit 4,52 g (23,85 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und die Reaktionslösung noch 1 weitere Stunde bei 13°C, gefolgt von 12 Stunden bei 22°C, gerührt. Die so erhaltene Reaktionslösung des N-Hydroxysuccinimidesters der Titelverbindung aus Beispiel 22g) wird nun bei 22°C tropfenweise mit einer Lösung von 1,43 g (0,20 mmol, entsprechend 13,23 mmol an freien Aminfunktionen), 64er-DSM-Polyamin, gelöst in 15 ml absolutem Dimethylsulfoxid, versetzt und weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung bei 22°C in 1,5 l Aceton eingetropft, wobei die Titelverbindung als farbloser Niederschlag ausfällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und über eine YM3-Ultrafiltrationsmembran (AMICON®) dreimal ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird in 300 ml destilliertem Wasser gelöst, filtriert und gefriergetrocknet. Ausbeute: 4,0 g (86,0 % d. Th., bezogen auf eingesetztes Polyamin) der oben genannten Titelverbindung als amorphen und farblosen Feststoff. Wassergehalt: 7,67 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 37.06	H 5.24	N 11.37	Gd 25.54
gef.:	C 37.13	H 5,37	N 11.22	Gd 25.32

Nach Elementaranalyse ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 59,3 % Gd-Gly-Me-DOTA (entsprechend 38 Gd-Gly-Me-DOTA-Einheiten pro Molekül). Die Bestimmung der im Polymer verbliebenen freien Aminofunktionen mittels

Ninhydrin und TNBS-Methode liefert als Mittelwert 40,7 % an freien Aminogruppen, d. h. im Polymermolekül liegen 26 freie Aminofunktion vor.

- 5 i) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ -[1-O-(4-Thioureido-tetraethylenglycolyl-phenyl)- β-D-galactopyranosyl]₂₆-Konjugat

Auf analoge Weise wie in Beispiel 1b) beschrieben, liefert die Umsetzung von 4,0 g (0,17 mmol, entsprechend 4,42 mmol an freien Aminfunktionen) der
10 Titelverbindung aus Beispiel 22h) mit 10.92 g (23,0 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 22e) nach Aufarbeitung 5,04 g (83,0 % d. Th. bezogen auf eingesetztes Polyamin) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Lyophilisat.

- 15 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.:	C 42.59	H 5.70	N 7.44	S 2,33	Gd 16.71
gef.:	C 42.38	H 5.84	N 7.63	S 2,43	Gd 16.89

Die quantitative Ninhydrinreaktion als auch die TNBS-Methode verlaufen
20 negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem molaren Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 26 β-D-Galactoseresten und 38 Gd-Gly-Me-DOTA Komplexen pro Molekül.

25

Beispiel 23

64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ -[1-O-(4- Thioureido-tetraethylenglycolyl-phenyl)-α-L-fucopyranosyl]₂₆-Konjugat

30

- a) α-L-Fucopyrannosyl-1-O-[(4-isothiocyanatophenyl)-tetraethylenglycol]

Auf analogem Wege, wie in den Beispielen 22a) bis 22e) für die Bildung der Titelverbindung aus Beispiel 22e) beschrieben , liefert die Umsetzung von
35 12,76 g α-L-Fucosetetraacetat (38,4 mmol; Kommerziell erhältlich; Sigma) 13,16 g (72,4 % d. Th.; über 4 Syntheseschritte) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Öl.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 52.26 H 6,60 N 2.96 S 6,77

gef.: C 52,44 H 6,69 N 3.08 S 6,68

5

b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ - [1-O-(4-Thioureido-tetraethylenglycolyl-pheny)-α -L-fucopyranosyl]₂₆-Konjugat

- 10 Durch eine analoge Reaktionsführung, wie in Beispiel 1b) beschrieben, führt die Umsetzung von 5,0 g (0,21 mmol, entsprechend 5,58 mmol an freien Aminofunktionen), der Titelverbindung aus Beispiel 22h) mit 13,73 g (29,0 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 23a) zur Bildung von 6,48 g (86,3 % d. Th.; bezogen auf eingesetztes Polyamin) der oben genannten Titelverbindung als
15 farbloses Lyophilisat.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 42.59 H 5.70 N 7.44 S 2,33 Gd 16.71

gef.: C 42.38 H 5.84 N 7.63 S 2,43 Gd 16.89

20

- Die quantitative Ninhydrinreaktion als auch die TNBS-Methode verlaufen negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus dem molaren Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 26 α-L-Fucoseresten und 38 Gd-Gly-Me-DOTA Komplexen pro Molekül.
25

Beispiel 24

- 30 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ -[1-O-(4- Thioureido-tetraethylenglycolyl-pheny)-α-D-mannopyranosyl]₂₆-Konjugat

a) α-D-Mannopyrannosyl-1-O-[(4-isothiocyanatophenyl)-tetraethylenglycol]

- 35 Auf analogem Wege, wie in den Beispielen 22a) bis 22e) für die Bildung der Titelverbindung aus Beispiel 22e) beschrieben, führt die Umsetzung von 15 g α-D-Mannosepentaacetat (38,4 mmol; Kommerziell erhältlich; Sigma) zur

Bildung von 13,22 g (72,4 % d. Th.; über 4 Syntheseschritte) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Öl.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

5	ber.:	C 53,26	H 6,60	N 2,96	S 6,77
	gef.:	C 53,13	H 6,69	N 3,04	S 6,84

- 10 b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ - [1-O-(4-Thioureido-tetraethylenglycolyl-phenyl)-α-D-mannopyranosyl]₂₆-Konjugat

Durch eine analoge Reaktionsführung, wie in Beispiel 1b) beschrieben, führt die Umsetzung von 5,0 g (0,21 mmol, entsprechend 5,58 mmol an freien Aminofunktionen), der Titelverbindung aus Beispiel 22h) mit 13,8 g (29,0 mmol) der
15 Titelverbindung aus Beispiel 24a) zur Bildung von 6,48 g (86,3 % d. Th.; bezogen auf eingesetztes Polyamin) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Lyophilisat.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

20	ber.:	C 42,59	H 5,70	N 7,44	S 2,33	Gd 16,71
	gef.:	C 42,38	H 5,84	N 7,63	S 2,43	Gd 16,89

Die quantitative Ninhydrinreaktion als auch die TNBS-Methode verlaufen negativ, d. h. das polymere Produkt enthält keine freien Aminofunktionen. Aus
25 dem molaren Schwefelwert der Elementaranalyse der Titelverbindung ergibt sich ein Beladungsgrad des Polymers mit 26 α-D-Mannoseresten und 38 Gd-Gly-Me-DOTA Komplexen pro Molekül.

30 Beispiel 25

64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ - [1-O-(4-Thioureido-tetraethylenglycolyl-phenyl)-β-D-glucopyranosyl]₂₆-Konjugat

- 35 a) 1-O-[4-Isothiocyanatophenyl]-tetraethylenglycolyl-β-D-glucopyranose

Auf analogem Wege wie in den Beispielen 22a) bis 22e) für die Bildung der Titelverbindung aus Beispiel 22e) beschrieben, führt die Umsetzung von 8,52 g (21,77 mmol) β -D-Glucosepentaacetat [Darstellung gemäß: Rosemann S., et al., Biochemistry, Vol. 8, No. 4, 1969, 1351-1359; Prihar, Behrmann, Biochemistry 1973, 12:997-1000 ;zu analogen Synthesen vgl. auch: Monsigny, M., et al., Biol. Cell., 51, 187 (1984)] zur Bildung von 8.17 g (79 % d. Th. über 4 Syntheseschritte) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Öl.

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 53,26 H 6,60 N 2.96 S 6,77

gef.: C 53,18 H 6,72 N 3.09 S 6,84

b) 64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ - [1-O-(4-Thioureido-tetraethylenglycolyl-phenyl)- β -D-glucopyranosyl]₂₆-Konjugat

Durch eine analoge Reaktionsdurchführung wie in Beispiel 1b) beschrieben, führt durch Umsetzung von 4,0 g (0,17 mmol, entsprechend 4,42 mmol an freien Aminfunktionen) der Titelverbindung aus Beispiel 22h) mit 10,92 g (23,0 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 25a) zur Bildung von 4,86 g (80,5 % d. Th., bezogen auf eingesetztes Polyamin) der oben genannten Titelverbindung als farbloses Lyophilisat.

25

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 46,19 H 5,95 N 9,58 S 2,82 Gd 9,87

gef.: C 46,30 H 5,90 N 9,69 S 2,66 Gd 9,78

30

Beispiel 26

Lymphknotenanreicherung nach i.v. Injektion

Die Titelverbindung aus Beispiel 2 [64er-DSM-Polyamin-(Gd-DTPA)₃₈-[1-(4-Thioureidophenyl)- α -D-mannopyranosyl]₂₆-Konjugat] wird in einer Dosierung von 200 μ mol Gd/kg Körpergewicht in Ratten injiziert. Zu verschiedenen

Zeitpunkten nach der Substanzapplikation wird die Gd-Konzentration in den Geweben des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS; Leber, Milz, mesenteriale und periphere Lymphknoten) mittels ICP-AES bestimmt.

Gd-Anreicherung [$\mu\text{mol/l}$] in Geweben des MPS 10 min, 1h und 24h nach intravenöser Applikation von 200 $\mu\text{mol/kg}$ Titelverbindung aus Beispiel 2 (MW \pm SD, n =3)

	Gd-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]		
	10 min p.i.	1h p.i.	24h p.i.
Leber	393 \pm 30	530 \pm 22	643 \pm 58
Milz	236 \pm 24	261 \pm 38	503 \pm 101
mes. LK	496 \pm 61	752 \pm 143	1274 \pm 140
periph. LK	286 \pm 51	638 \pm 73	1258 \pm 231

Die Zunahme der Gd-Konzentrationen ist in den Lymphknoten am stärksten ausgeprägt. Bereits ab 1h p.i. ist auch die absolute Gd-Konzentration in den Lymphknoten deutlich höher als in Leber und Milz. Die Substanz reichert sich in allen Lymphknotengruppen ähnlich gut an, denn die Gd-Konzentration ist in den mesenterialen und peripheren Lymphknoten gleichmäßig verteilt. Somit wird das Ziel einer Substanzanreicherung in allen Lymphknotengruppen von dieser, aber auch von den anderen, hier beschriebenen, erfindungsgemäßen Substanzen erfüllt. Aufgrund der äußerst hohen Gd-Konzentration in den Lymphknoten 24h p.i. sowie einer sehr hohen Relaxivity der erfindungsgemäßen Substanzen ($R_1(\text{in Wasser}) = 17.0 \text{ L/mmol} \cdot \text{sec}$) kann für die intravenöse MR-Lymphographie mit diesen Substanzen auch mit sehr geringen Dosierungen ($\geq 10 \mu\text{mol Gd/kg}$) gearbeitet werden.

Beispiel 27

MR-Imaging nach i.v. Injektion

Die Titelverbindung aus Beispiel 24 [64er-DSM-Polyamin-(Gd-Gly Me-DOTA-Amid)₃₈ -[1-O-(4-Thioureido-tetraethylenglycolyl-phenyl)- α -D-mannopyranosyl]₂₆-Konjugat wird in einer Dosierung von 200 $\mu\text{mol Gd/kg}$ Körpergewicht in Ratten injiziert. Die Signalbeeinflussung wird in verschiedenen Lymphknotengruppen *ex vivo* untersucht.

T1-gewicht tes ex vivo MR-Image (SE 400/15) von in Agar eingebetteten Lymphknotengruppen nach intravenöser Applikation von 200 µmol der Titelverbindung aus Beispiel 24 in Ratten (Abbildungen 1 und 2)

5

Auch in der Bildgebung wird die Eignung der erfindungsgemäßen Substanzen für die intravenöse MR-Lymphographie deutlich, denn in allen untersuchten Lymphknotengruppen kann 24h p.i. ein deutliches Enhancement beobachtet werden.

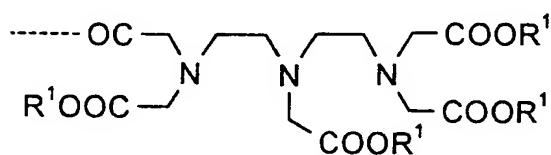
Patentansprüche

1. Konjugate bestehend aus einem aminogruppen-enthaltenden dendritischen Polymeren, dessen Zweige aus Vinylcyanid-Einheiten hergestellt sind,
 5 Metallion(en) enthaltenden signalgebenden Gruppe(n) und Mono- oder Oligosacchariden sowie gegebenenfalls Kationen anorganischer und/oder organischer Basen, Aminosäuren oder Aminosäureamide.
2. Konjugate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie gemäß der
 10 allgemeinen Formel I aufgebaut sind

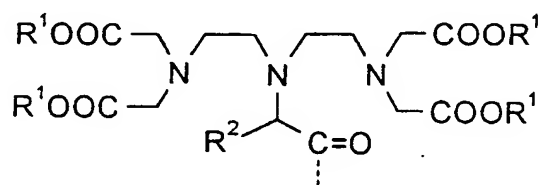
$$P (K)_m (L-Z)_n \quad (I),$$
 worin
 - 15 P für ein k Aminogruppen - von denen (n+m) jeweils um ein Wasserstoffatom vermindert sind - enthaltendes dendritisches Polymer, dessen Zweige aus Vinylcyanid-Einheiten hergestellt sind, wobei $(n + m) \leq k$ sein soll,
 n und m jeweils für die ganzen Zahlen 1 bis 149,
 k für die Zahlen 12 bis 150,
 - 20 K für eine Metallion(en) enthaltende signalgebende Gruppe,
 L für einen Linker und
 Z für ein um eine Hydroxylgruppe vermindertes Mono- oder Oligosaccharid stehen.
- 25 3. Konjugate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Summe (n + m) der signalgebenden Gruppen (K) und der über L gebundenen jeweils um eine Hydroxylgruppe verminderten Mono- oder Polysaccharide (Z) gleich der Anzahl k der im Polymeren enthaltenden Aminogruppen ist.
- 30 4. Konjugate gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß k für die Zahlen 32 oder 64 steht.
5. Konjugate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß P für ein k Aminogruppen, von denen (n + m) jeweils um ein Wasserstoffatom vermindert sind, enthaltendes dendritisches Polymer steht,
 35 dessen Äste aus Acrylnitril oder Methacrylnitril aufgebaut sind.

6. Konjugate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie als signalgebende Gruppe K einen Chelatkomplex bestehend aus einem Rest der allgemeinen Formel II, III, IV, V oder VI enthalten.

5

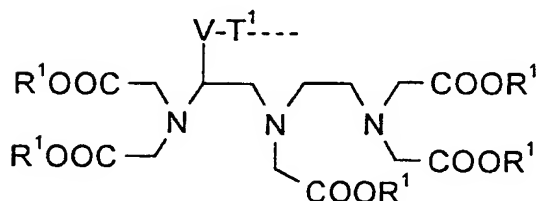


(II),

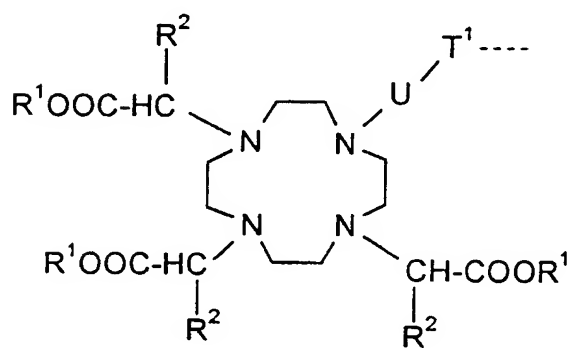


(III),

10

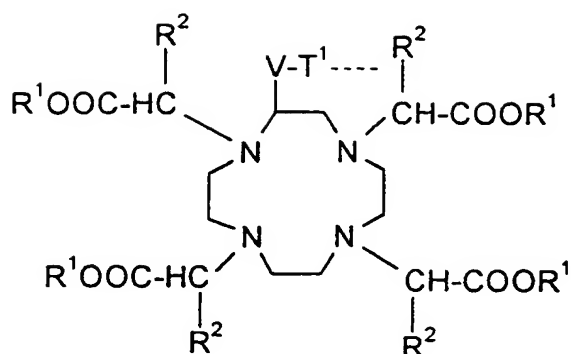


(IV),



(V),

15

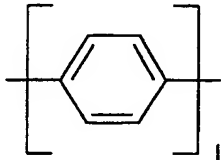


(VI),

5 worin

R^1 unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder ein Metallionenäquivalent der Elemente der Ordnungszahlen 20-32, 37 - 39, 42 - 44, 49 oder 57-83,

10 R^2 ein Wasserstoffatom, einen geradkettigen oder verzweigten C_1 - C_7 -Alkylrest, einen Phenyl- oder Benzylrest,

V eine $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_o-(\text{O})_p$  gruppe mit

o in der Bedeutung der Zahlen 0 bis 10,

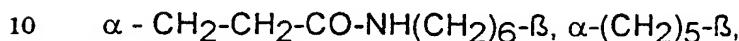
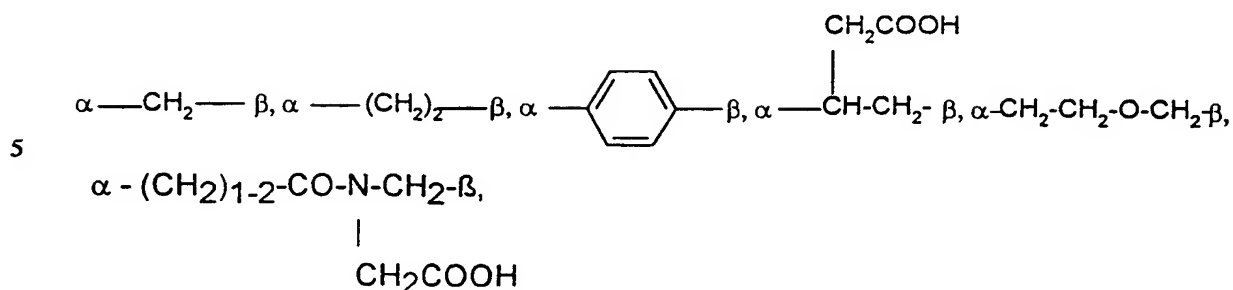
15 p und l jeweils in der Bedeutung der Ziffern 0 oder 1, mit der Maßgabe, daß p nur dann für die Ziffer 1 steht wenn l die Ziffer 1 bedeutet,

T^1 eine $-\text{NHCS}-$ oder $-\text{CO}-$ gruppe,

20 U eine $-\text{CHR}^3-\text{CONR}^3-\text{M}^1-$ oder $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{M}^2-$ gruppe mit R^3 unabhängig voneinander in der Bedeutung von R^2 oder der Gruppe $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_o-\text{COOH}$ und M^1 und M^2 jeweils in der Bedeutung eines Phenylenrestes oder einer geradkettigen, verzweigten, gesättigten oder ungesättigten C_1 - C_{20} -Alkylkette, die gegebenenfalls substituiert ist durch 1-5 $(\text{CH}_2)_o-\text{COOH}$, 1-5 OR^2 -reste oder 1-8 Sauerstoffatome, 1-2-NH-, 1-2-C(=NH)-, 1-5- CONR^3 -, 1-5- $\text{NR}^3\text{CO}-$, 1-2 Phenyl- oder 1-2 Phenylendioxygruppen enthält, bedeuten, mit der Maßgabe, daß mindestens zwei der Reste R^1 für Metall-

25 ionenäquivalente der Elemente der oben genannten Ordnungszahlen stehen.

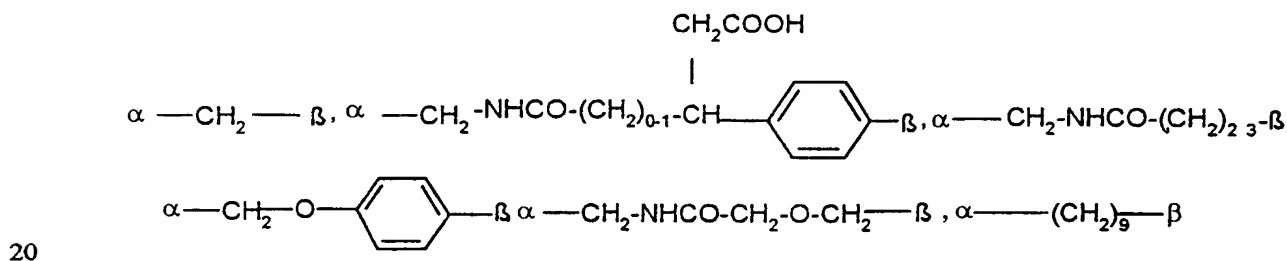
7. Konjugate gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß M¹ für eine Gruppe



steht, wobei α die Verknüpfungsstelle an den Rest-CONR³ und β die Verknüpfungsstelle an T¹ angibt.

15

8. Konjugate gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß M² für eine Gruppe



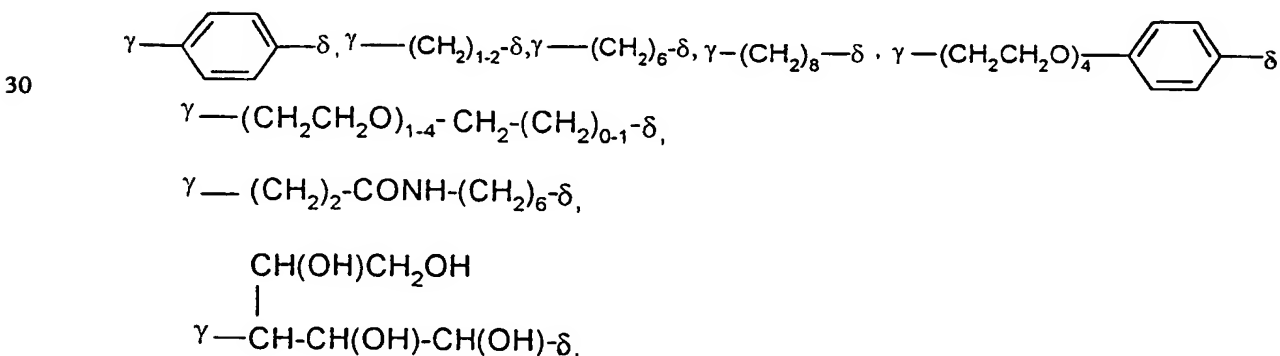
steht, wobei α die Verknüpfungsstelle an den Rest-CH(OH)-und β die Verknüpfungsstelle an T¹ angibt.

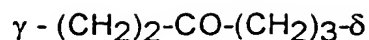
25

9. Konjugate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Monosaccharide Hexosen, Pentosen oder N-Acetyl-neuraminosäure, die jeweils in der Pyranose- oder Furanose-Form vorliegen, oder deren Derivate enthalten.

30

10. Konjugate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Monosaccharide Hexosen, die in der Pyranose-Form vorliegen, oder deren Derivate enthalten.
- 5 11. Konjugate gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Monosaccharide als 2-Amino-2-deoxy-, N-Acetyl-2-amino-2-deoxy-, 6-Deoxy-, 2-Deoxy-, 5-Carboxy- oder 1-Amino-1-deoxy-Derivate vorliegen.
- 10 12. Konjugate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Oligosaccharide aufgebaut aus den Monosacchariden gemäß Anspruch 9 enthalten.
13. Konjugate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Z für ein am C-1-Atom um eine Hydroxylgruppe vermindertes Mono- oder Oligosaccharid steht.
- 15 14. Konjugate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Z für ein am C-2-Atom um eine Hydroxylgruppe vermindertes Mono- oder Oligosaccharid steht.
- 20 15. Konjugate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß L für eine Gruppe T^2-M^3-X steht, wobei M^3 für eine direkte Bindung steht oder die für M^1 angegebene Bedeutung hat, T^2 für eine -NHCS-, -C(=NH)-, -CH₂- oder CO-gruppe steht und an P bindet, X für NH, CO, O und S steht und an Z bindet.
- 25 16. Konjugate gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß M^3 für eine direkte Bindung oder für die Gruppen

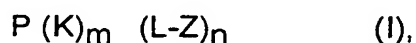




steht, wobei γ die Verknüpfungsstelle an X und δ die Verknüpfungsstelle an T² angibt.

5

17. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1,



10 worin

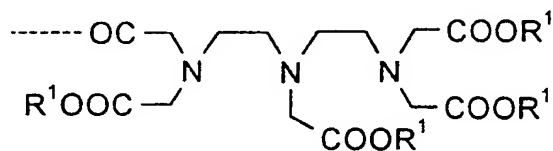
P für ein k Aminogruppen - von denen (n+m) jeweils um ein Wasserstoffatom vermindert sind - enthaltendes dendritisches Polymer, dessen Zweige aus Vinylcyanid-Einheiten hergestellt sind, wobei $(n + m) \leq k$ sein soll,

n und m jeweils für die ganzen Zahlen 1 bis 149,

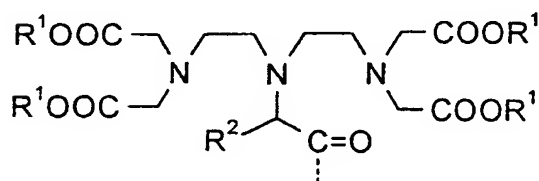
15 k für die Zahlen 12 bis 150,

K als eine magnetische(s) Metallion(en) enthaltende signalgebende Gruppe für einen Chelatkomplex bestehend aus einem Rest der allgemeinen Formel II, III, IV, V oder VI

20

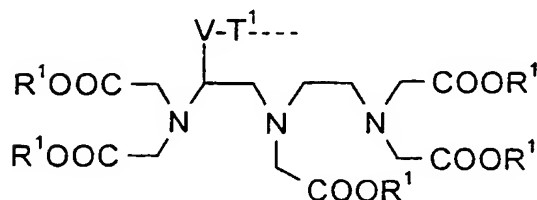


(II),

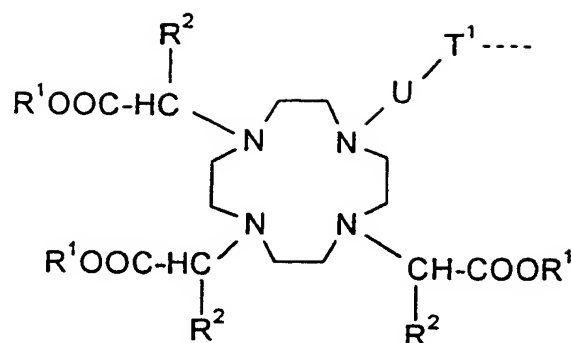


(III),

25

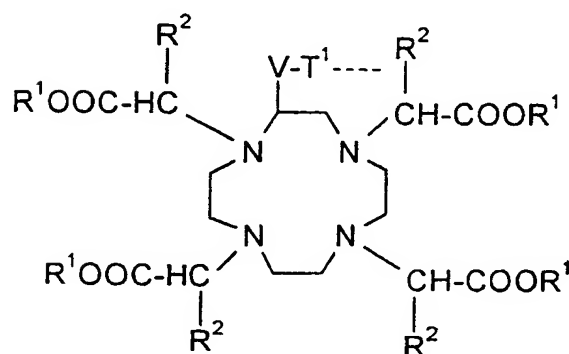


(IV),



(V),

5



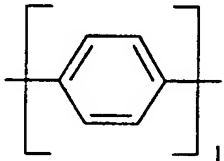
(VI),

10 worin

R^1 unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder ein Metallionenäquivalent der Elemente der Ordnungszahlen 20-32, 37 - 39, 42 - 44, 49 oder 57-83,

R^2 ein Wasserstoffatom, einen geradkettigen oder verzweigten C_1 - C_7 -Alkylrest, einen Phenyl- oder Benzylrest,

15

V eine $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_o-(\text{O})_p$  gruppe mit

o in der Bedeutung der Zahlen 0 bis 10,

p und l jeweils in der Bedeutung der Ziffern 0 oder 1, mit der Maßgabe, daß p nur dann für die Ziffer 1 steht, wenn l die Ziffer 1 bedeutet,

T¹ eine -NHCS- oder -CO-gruppe,

U eine -CHR³-CONR³-M¹- oder -CH₂-CH(OH)-M²- gruppe mit R³ unabhängig voneinander in der Bedeutung von R² oder der Gruppe -CH₂-(CH₂)₆-COOH und M¹ und M² jeweils in der Bedeutung eines Phenylenrestes oder einer geradkettigen, verzweigten, gesättigten oder ungesättigten C₁-C₂₀-Alkylkette, die gegebenenfalls substituiert ist durch 1-5 (CH₂)₆-COOH, 1-5 OR² -reste oder 1-8 Sauerstoffatome, 1-2-NH-, 1-2-C(=NH)-, 1-5-CONR³-, 1-5-NR³CO-, 1-2 Phenylen- oder 1-2 Phenylenoxygruppen enthält, bedeuten, mit der Maßgabe, daß mindestens zwei der Reste R¹ für Metallionenäquivalente der Elemente der oben genannten Ordnungszahlen stehen,

L für einen Linker und

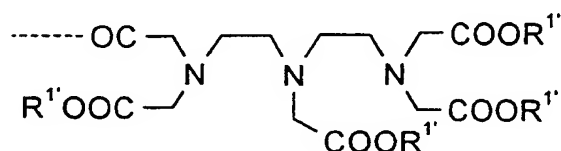
Z für ein um eine Hydroxylgruppe vermindertes Mono- oder Oligosaccharid stehen, dadurch gekennzeichnet, daß

a) ein Polymer-komplex(bildner)-Konjugat der allgemeinen Formel VII



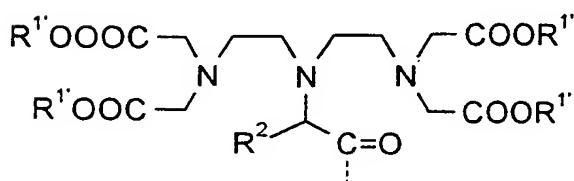
worin

K' für einen Rest der allgemeinen Formel II', III', IV', V' oder VI'

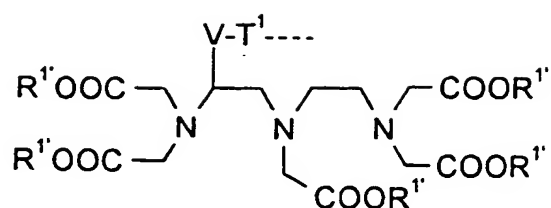


(II'),

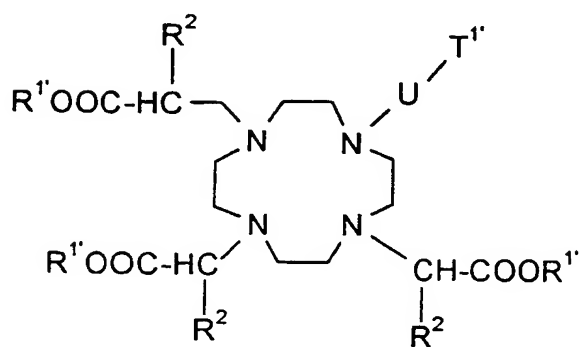
25



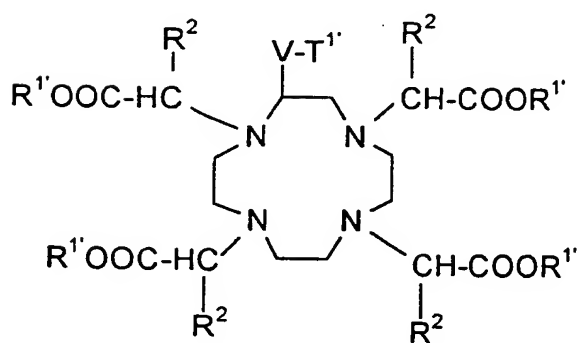
(III'),



(IV')



(V')



(VI')

worin

- 15 R^1 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine Säureschutzgruppe oder ein Metallionenäquivalent der Elemente der Ordnungszahlen 20-29, 39, 42, 44 oder 57-83 steht und
 R^2 , V, o, p, T und U die oben genannte Bedeutung haben,

L^*-Z' (VIII),

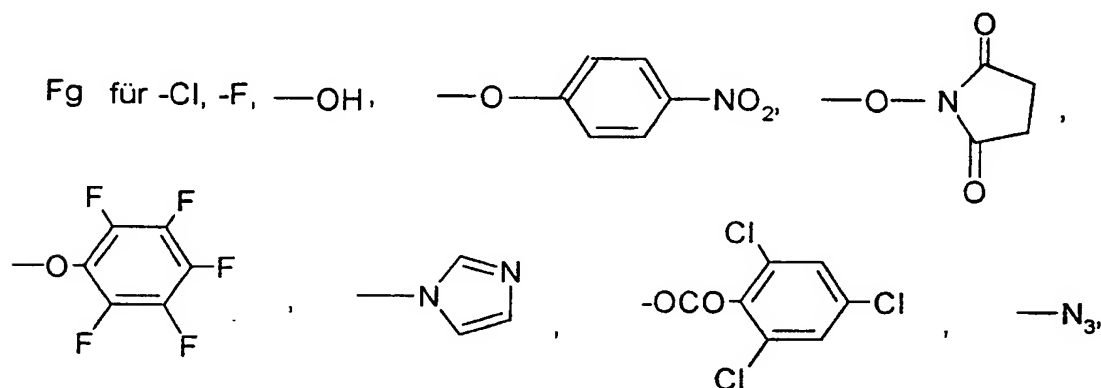
worin

$n' = 1 - 3 n$,

5 Z' die für Z genannte Bedeutung hat, wobei jedoch die in Z gegebenenfalls enthaltenen Carboxy-, Amino- und Hydroxygruppen gegebenenfalls geschützt sind,

L^* für eine Gruppe $T^{2'}-M^{3'}-X$ mit

$T^{2'}$ in der Bedeutung von $-NCS$, $-C(=NH)OCH_3$, $-CHO$, einer $-CO-Fg$ -gruppe
10 wobei



$-O-CO-R^4$ mit R^4 in der Bedeutung einer geradkettigen oder verzweigten C_1-C_7 -Alkylkette,

15 $M^{3'}$ die für M^3 angegebene Bedeutung hat, wobei jedoch die in M^3 gegebenenfalls enthaltenen Carboxygruppen gegebenenfalls geschützt sind, und

X für NH , CO , O und S steht,
oder

20 b) ein Polymersaccharid-Konjugat der allgemeinen Formel IX

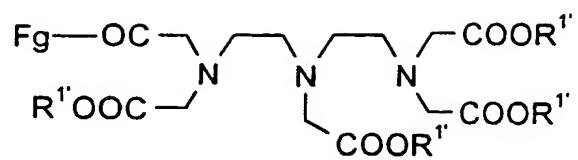
$P(L'-Z')_n$ (IX),

worin

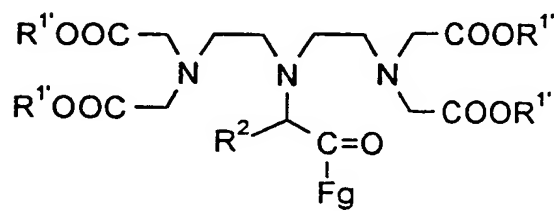
25 L' die für L genannte Bedeutung hat, wobei jedoch die in L gegebenenfalls enthaltenen Carboxygruppen gegebenenfalls geschützt sind und

P , Z' und n die oben genannte Bedeutung haben,

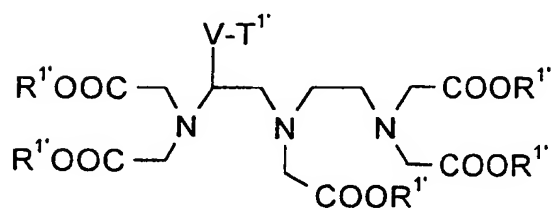
mit m' Komplexen oder Komplexbildnern K^* , wobei $m' = 1 - 3 m$ ist und K^* für Verbindungen der allgemeinen Formeln



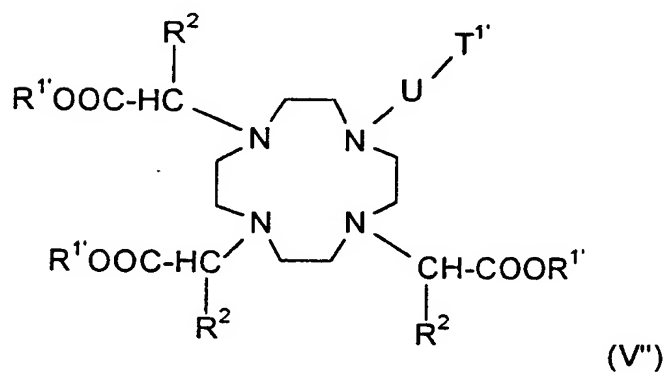
(II''),



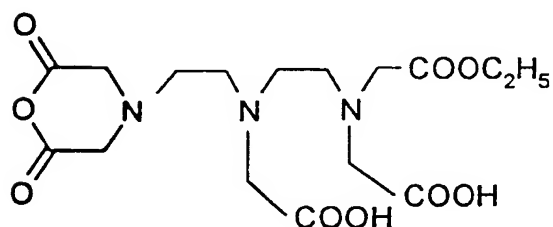
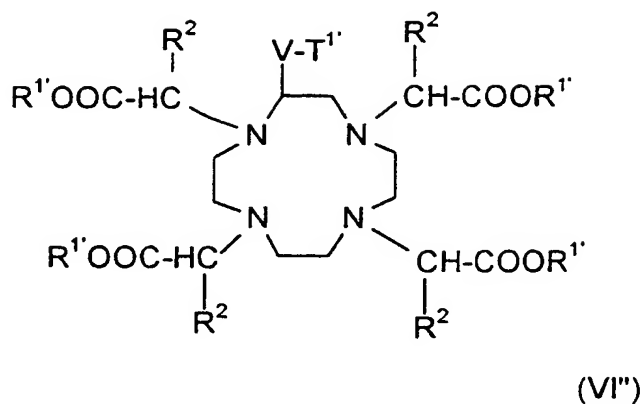
(III''),



(IV''),



(V'')



5

worin

R^1 , R^2 , V, U und Fg die oben genannte Bedeutung haben, und T^1 für -NCS, -CO-Fg, -C(=NH)OCH₃ oder -CHO steht oder

10

c) ein Polymer der allgemeinen Formel X

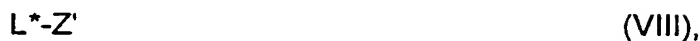


15

worin

P und k die oben angegebenen Bedeutungen haben, in einer Eintopfreaktion mit n' Mono- oder Oligosacchariden der allgemeinen Formel VIII

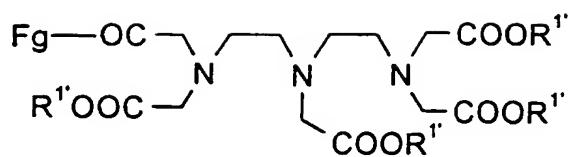
20



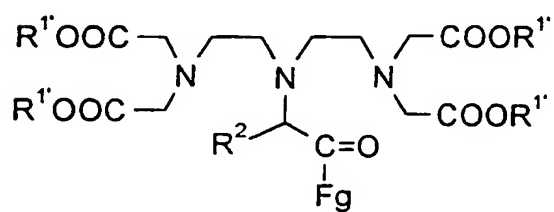
worin

n', L^* und Z' die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit m' Komplexen oder Komplexbildnern K^* , wobei K^* für Verbindungen der allgemeinen Formeln

25

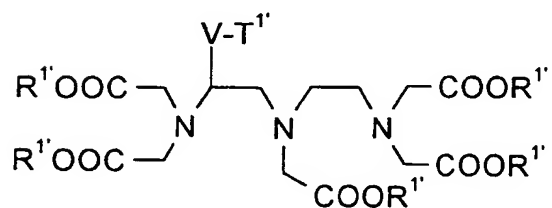


(II''),

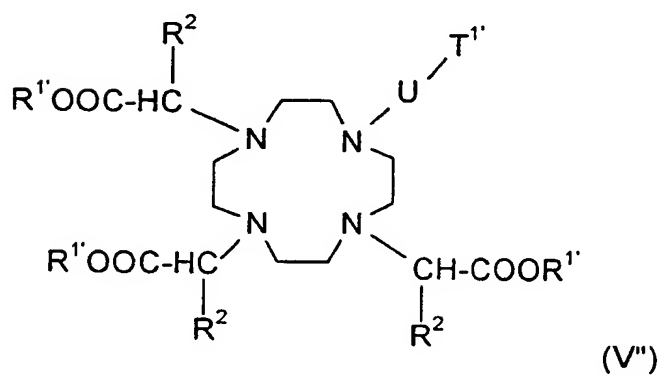


(III''),

5

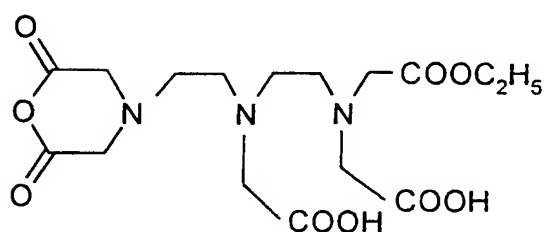
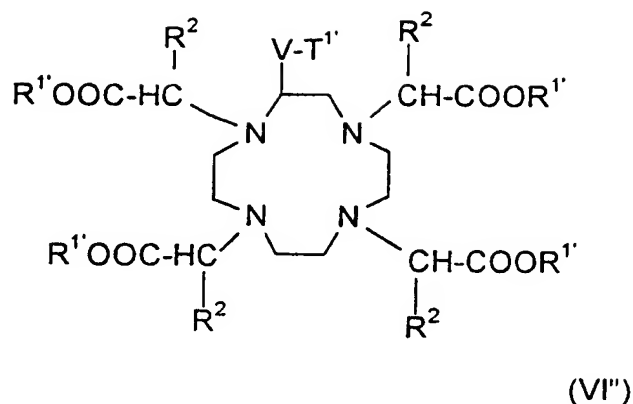


(IV''),



(V'')

10



5

worin

m', R¹', R², V, T¹', U und Fg die oben genannte Bedeutung haben, umgesetzt wird, wobei die gegebenenfalls notwendige Metallioneneinführung vor oder nach der gegebenenfalls notwendigen Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt, mit der Maßgabe, daß falls R¹' für Schutzgruppen steht, diese vor der Metallioneneinführung abzuspalten sind.

10

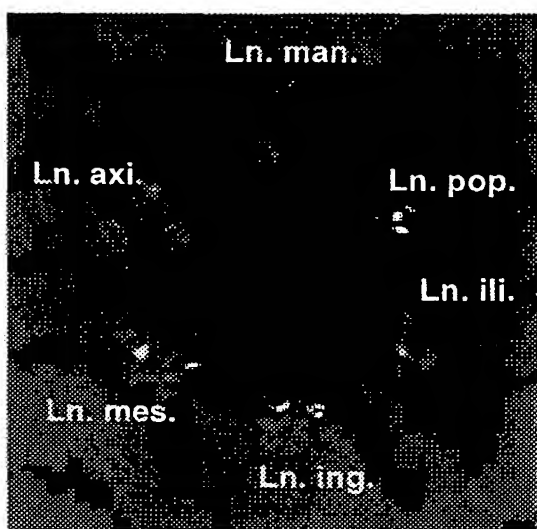
15 18. Pharmazeutisches Mittel enthaltend mindestens ein Konjugat nach Anspruch 1, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen.

20 19. Diagnostisches Mittel enthaltend mindestens ein Konjugat nach Anspruch 1, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen für die NMR-Bildgebung.

25 20. Diagnostisches Mittel nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es für die NMR-Lymphographie verwendet wird.

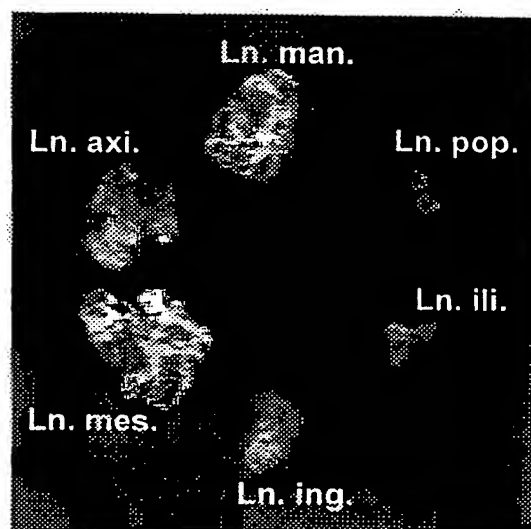
21. Diagnostisches Mittel enthaltend mindestens ein Konjugat nach Anspruch 1, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen für die Röntgen-Diagnostik.
- 5
22. Diagnostisches Mittel enthaltend mindestens ein Konjugat nach Anspruch 1, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen für die Radio-Diagnostik und Radio-Therapie.
- 10
23. Verwendung von mindestens einem physiologisch verträglichen Konjugat gemäß Anspruch 1 für die Herstellung von diagnostischen Mitteln für die NMR-Diagnostik.
- 15
24. Verwendung von mindestens einem physiologisch verträglichen Konjugat gemäß Anspruch 1 für die Herstellung von diagnostischen Mitteln für die NMR-Lymphographie.
- 20
25. Verfahren zur Herstellung der pharmazeutischen Mittel nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man das in Wasser oder physiologischer Salzlösung gelöste oder suspendierte Konjugat, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen, in eine für die enterale oder parenterale Applikation geeignete Form bringt.

Abbildung 1



Präkontrast

Abbildung 2



24 h p.i.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/07927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ASHTON, PETER R. ET AL: "Synthetic carbohydrate dendrimers. 3. Synthesis of glycodendrimers by modification of poly(propylene imine) dendrimers" CHEM.--EUR. J. (JUNE 1997), 3(6), 974-984 CODEN: CEUJED;ISSN: 0947-6539, XP002102633 see the whole document ---	1-25
P, Y	PEERLINGS, H. W. I. ET AL: "Synthesis of spacer-armed glucodendrimers based on the modification of poly(propylene imine) dendrimers" EUR. J. ORG. CHEM. (AUGUST 1998), (9), 1879-1886 CODEN: EJOCFK;ISSN: 1434-193X, XP002102634 see the whole document ---	1-25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 1999

Date of mailing of the international search report

10/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Veronese, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/EP 98/07927

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JAYARAMAN N ET AL: "SYNTHETIC CARBOHYDRATE-CONTAINING DENDRIMERS" CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, vol. 3, no. 8, 1 August 1997, pages 1193-1199, XP000659530 see scheme 4	1-25
Y	ISSBERNER J ET AL: "POLY(AMINE/IMINE) DENDRIMERS BEARING PLANAR CHIRAL TERMINAL GROUPS - SUNTHESIS AND CHIROPTICAL PROPERTIES" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, vol. 7, no. 8, 1 July 1996, pages 2223-2232, XP002037380 see page 2228, last paragraph see "conclusions" see page 2229	1-25
Y	DAVID R. VERA ET AL.: "Sentinel Node Imaging Via a Nonparticulate Receptor-Binding Radiotracer" THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 38, no. 4, May 1997, pages 530-535, XP002083554 see page 531: "synthesis" see figure 1 see page 534, line 33-35	1-25
Y	VERA D R ET AL: "A molecular receptor-binding contrast agent for magnetic resonance imaging of the liver." ACADEMIC RADIOLOGY, (1995 JUN) 2 (6) 497-506. JOURNAL CODE: CLV. ISSN: 1076-6332., XP002083555 United States see page 505, column 1, line 2-5; figure 1	1-25
Y	ZHUO, REN XI ET AL: "Synthesis, relaxivity and biodistribution of novel magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents: polylysine (Gd-DTPA/DOXA) with pendent galactose moieties as hepatocyte-targeting groups" CHIN. CHEM. LETT. (1997), 8(2), 157-160 CODEN: CCLEE7, February 1997, XP002083557 * See abstract and compounds in scheme 1 *	1-25
Y	DE 195 49 286 A (SCHERING AG) 26 June 1997 see examples 1L, 2G, 3G, 4B, see examples 5H, 6, 7G, 8G see claims 1-15	1-25

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/EP 98/07927

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 195 25 924 A (SCHERING AG) 9 January 1997 cited in the application see examples 1K,2F,3E,4I, see examples 5H,6D see claims 1-15 -----	1-25
Y	DE 44 25 857 A (SCHERING AG) 11 January 1996 cited in the application see the whole document -----	1-25
A	WIENER E C ET AL: "DENDRIMER-BASED METAL CHELATES: A NEW CLASS OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING CONTRAST AGENTS" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, vol. 31, no. 1, 1 January 1994, pages 1-8, XP000423671 see the whole document -----	1-25
A	LINDHORST T K ET AL: "GLYCOCOATING OF OLIGOVALENT AMINES: SYNTHESIS OF THIOUREA-BRIDGED CLUSTER GLYCOSIDES FROM GLYCOSYL ISOTHIOCYANATES" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, vol. 35, no. 17, 1996, pages 1953-1956, XP002042915 see the whole document -----	1-25
A	WO 95 24221 A (BROTHERS HERBERT M II ;HEDSTRAND DAVID M (US); KRUPER WILLIAM J JR) 14 September 1995 see claims 16,17,22-25,59; examples 27,65 -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ EP 98/ 07927

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see additional sheet next indications PCT/ ISA/ 210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/07927

In view of the large amount of compounds, which are defined by the general definition in claims 1-25, the search had to be restricted for economic reasons. The search was limited to the compounds for which pharmacological data was given and/or the compounds explicitly mentioned in the application, and to the general idea underlying the application (see guidelines, Part b, chapter III, paragraph 3.6).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/07927

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19549286 A	26-06-1997	AU 1032897 A	17-07-1997
		CA 2241187 A	03-07-1997
		CZ 9801981 A	16-09-1998
		WO 9723245 A	03-07-1997
		EP 0868202 A	07-10-1998
		NO 982903 A	22-06-1998
		PL 327977 A	04-01-1999
		US 5874061 A	23-02-1999
DE 19525924 A	09-01-1997	AU 6358696 A	05-02-1997
		BG 102111 A	31-08-1998
		CA 2225959 A	23-01-1997
		CZ 9800003 A	15-04-1998
		WO 9702051 A	23-01-1997
		EP 0836485 A	22-04-1998
		NO 980002 A	04-03-1998
		PL 324342 A	25-05-1998
		SK 177997 A	08-07-1998
		US 5820849 A	13-10-1998
DE 4425857 A	11-01-1996	AU 697203 B	01-10-1998
		AU 2980895 A	09-02-1996
		CA 2194560 A	25-01-1996
		CN 1151701 A	11-06-1997
		CZ 9700031 A	16-07-1997
		WO 9601655 A	25-01-1996
		EP 0768898 A	23-04-1997
		HU 76804 A	28-11-1997
		JP 10502679 T	10-03-1998
		NO 970055 A	06-03-1997
		NZ 289845 A	29-03-1999
		PL 318043 A	12-05-1997
		SI 9520068 A	31-10-1997
		SK 167496 A	09-07-1997
		ZA 9505682 A	22-02-1996
WO 9524221 A	14-09-1995	US 5338532 A	16-08-1994
		US 5527524 A	18-06-1996
		AT 89743 T	15-06-1993
		AU 609051 B	26-04-1991
		AU 7715987 A	03-03-1988
		AU 638153 B	17-06-1993
		AU 8139191 A	03-10-1991
		CA 1316456 A	20-04-1993
		CA 1316524 A	20-04-1993
		CA 1316364 A	20-04-1993
		DE 3786000 A	01-07-1993
		DE 3786000 T	21-08-1997
		DK 205388 A	14-06-1988
		EP 0271180 A	15-06-1988
		ES 2054678 T	16-08-1994
		FI 881768 A	15-04-1988
		FI 981807 A	24-08-1998
		GR 3024215 T	31-10-1997
		HK 54396 A	03-04-1996
		HU 209252 B	28-04-1994
		IE 61356 B	02-11-1994
		JP 2848218 B	20-01-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/07927

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9524221 A		JP 6220190 A	09-08-1994
		JP 6219966 A	09-08-1994
		JP 7108860 B	22-11-1995
		JP 2771404 B	02-07-1998
		JP 6009778 A	18-01-1994
		JP 7057735 B	21-06-1995
		JP 63502350 T	08-09-1988
		JP 7057736 B	21-06-1995
		JP 63501876 T	28-07-1988
		JP 7002840 B	18-01-1995
		JP 63501878 T	28-07-1988
		KR 9711151 B	07-07-1997
		MX 169992 B	04-08-1993
		NO 176306 B	05-12-1996
		WO 8801178 A	25-02-1988
		WO 8801179 A	25-02-1988
		WO 8801180 A	25-02-1988
		US 5560929 A	01-10-1996
		US 5714166 A	03-02-1994
		AU 2118195 A	25-09-1995
		CA 2161684 A	14-09-1995
		DE 699079 T	25-09-1997
		EP 0699079 A	06-03-1996
		ES 2104518 T	16-10-1997
		FI 955320 A	24-11-1995
		GR 97300044 T	28-11-1997
		JP 8510761 T	12-11-1996
		NO 954434 A	05-01-1996

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ASHTON, PETER R. ET AL: "Synthetic carbohydrate dendrimers. 3. Synthesis of glycodendrimers by modification of poly(propylene imine) dendrimers" CHEM.--EUR. J. (JUNE 1997), 3(6), 974-984 CODEN: CEUJED;ISSN: 0947-6539, XP002102633 siehe das ganze Dokument ---	1-25
P,Y	PEERLINGS, H. W. I. ET AL: "Synthesis of spacer-armed glucodendrimers based on the modification of poly(propylene imine) dendrimers" EUR. J. ORG. CHEM. (AUGUST 1998), (9), 1879-1886 CODEN: EJOCFK;ISSN: 1434-193X, XP002102634 siehe das ganze Dokument --- -/--	1-25



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Mai 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Veronese, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JAYARAMAN N ET AL: "SYNTHETIC CARBOHYDRATE-CONTAINING DENDRIMERS" CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, Bd. 3, Nr. 8, 1. August 1997, Seiten 1193-1199, XP000659530 * siehe schema 4 *	1-25
Y	ISSBERNER J ET AL: "POLY(AMINE/IMINE) DENDRIMERS BEARING PLANAR CHIRAL TERMINAL GROUPS - SUNTHESIS AND CHIROPTICAL PROPERTIES" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, Bd. 7, Nr. 8, 1. Juli 1996, Seiten 2223-2232, XP002037380 siehe Seite 2228, letzter Absatz * Siehe "Conclusions" * siehe Seite 2229	1-25
Y	DAVID R. VERA ET AL.: "Sentinel Node Imaging Via a Nonparticulate Receptor-Binding Radiotracer" THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, Bd. 38, Nr. 4, Mai 1997, Seiten 530-535, XP002083554 * Siehe pag 531: "Synthesis" * siehe Abbildung 1 siehe Seite 534, Zeile 33-35	1-25
Y	VERA D R ET AL: "A molecular receptor-binding contrast agent for magnetic resonance imaging of the liver." ACADEMIC RADIOLOGY, (1995 JUN) 2 (6) 497-506. JOURNAL CODE: CLV. ISSN: 1076-6332., XP002083555 United States siehe Seite 505, Spalte 1, Zeile 2-5; Abbildung 1	1-25
Y	ZHUO, REN XI ET AL: "Synthesis, relaxivity and biodistribution of novel magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents: polylysine (Gd-DTPA/DOXA) with pendent galactose moieties as hepatocyte-targeting groups" CHIN. CHEM. LETT. (1997), 8(2), 157-160 CODEN: CCLEE7.Februar 1997, XP002083557 siehe zusammenfassung und verbindungen in schema 1	1-25
Y	DE 195 49 286 A (SCHERING AG) 26. Juni 1997 siehe Beispiele 1L,2G,3G,4B, siehe Beispiele 5H,6,7G,8G siehe Ansprüche 1-15	1-25

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 195 25 924 A (SCHERING AG) 9. Januar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiele 1K,2F,3E,4I, siehe Beispiele 5H,6D siehe Ansprüche 1-15 ----	1-25
Y	DE 44 25 857 A (SCHERING AG) 11. Januar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1-25
A	WIENER E C ET AL: "DENDRIMER-BASED METAL CHELATES: A NEW CLASS OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING CONTRAST AGENTS" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, Bd. 31, Nr. 1, 1. Januar 1994, Seiten 1-8, XP000423671 siehe das ganze Dokument ----	1-25
A	LINDHORST T K ET AL: "GLYCOCOATING OF OLIGOVALENT AMINES: SYNTHESIS OF THIOUREA-BRIDGED CLUSTER GLYCOSIDES FROM GLYCOSYL ISOTHIOCYANATES" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, Bd. 35, Nr. 17, 1996, Seiten 1953-1956, XP002042915 siehe das ganze Dokument ----	1-25
A	WO 95 24221 A (BROTHERS HERBERT M II ;HEDSTRAND DAVID M (US); KRUPER WILLIAM J JR) 14. September 1995 siehe Ansprüche 16,17,22-25,59; Beispiele 27,65 -----	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07927

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. -
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. -
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

In view of the large amount of compounds, which are defined by the general definition in claims 1-25, the search had to be restricted for economic reasons. The search was limited to the compounds for which pharmacological data was given and/or the compounds explicitly mentioned in the application, and to the general idea underlying the application (see guidelines, Part b, chapter III, paragraph 3.6).

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07927

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19549286 A	26-06-1997	AU 1032897 A	17-07-1997
		CA 2241187 A	03-07-1997
		CZ 9801981 A	16-09-1998
		WO 9723245 A	03-07-1997
		EP 0868202 A	07-10-1998
		NO 982903 A	22-06-1998
		PL 327977 A	04-01-1999
		US 5874061 A	23-02-1999
DE 19525924 A	09-01-1997	AU 6358696 A	05-02-1997
		BG 102111 A	31-08-1998
		CA 2225959 A	23-01-1997
		CZ 9800003 A	15-04-1998
		WO 9702051 A	23-01-1997
		EP 0836485 A	22-04-1998
		NO 980002 A	04-03-1998
		PL 324342 A	25-05-1998
		SK 177997 A	08-07-1998
		US 5820849 A	13-10-1998
DE 4425857 A	11-01-1996	AU 697203 B	01-10-1998
		AU 2980895 A	09-02-1996
		CA 2194560 A	25-01-1996
		CN 1151701 A	11-06-1997
		CZ 9700031 A	16-07-1997
		WO 9601655 A	25-01-1996
		EP 0768898 A	23-04-1997
		HU 76804 A	28-11-1997
		JP 10502679 T	10-03-1998
		NO 970055 A	06-03-1997
		NZ 289845 A	29-03-1999
		PL 318043 A	12-05-1997
		SI 9520068 A	31-10-1997
		SK 167496 A	09-07-1997
		ZA 9505682 A	22-02-1996
WO 9524221 A	14-09-1995	US 5338532 A	16-08-1994
		US 5527524 A	18-06-1996
		AT 89743 T	15-06-1993
		AU 609051 B	26-04-1991
		AU 7715987 A	03-03-1988
		AU 638153 B	17-06-1993
		AU 8139191 A	03-10-1991
		CA 1316456 A	20-04-1993
		CA 1316524 A	20-04-1993
		CA 1316364 A	20-04-1993
		DE 3786000 A	01-07-1993
		DE 3786000 T	21-08-1997
		DK 205388 A	14-06-1988
		EP 0271180 A	15-06-1988
		ES 2054678 T	16-08-1994
		FI 881768 A	15-04-1988
		FI 981807 A	24-08-1998
		GR 3024215 T	31-10-1997
		HK 54396 A	03-04-1996
		HU 209252 B	28-04-1994
		IE 61356 B	02-11-1994
		JP 2848218 B	20-01-1999

INTERNATIONALE RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07927

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9524221 A		JP 6220190 A	09-08-1994
		JP 6219966 A	09-08-1994
		JP 7108860 B	22-11-1995
		JP 2771404 B	02-07-1998
		JP 6009778 A	18-01-1994
		JP 7057735 B	21-06-1995
		JP 63502350 T	08-09-1988
		JP 7057736 B	21-06-1995
		JP 63501876 T	28-07-1988
		JP 7002840 B	18-01-1995
		JP 63501878 T	28-07-1988
		KR 9711151 B	07-07-1997
		MX 169992 B	04-08-1993
		NO 176306 B	05-12-1996
		WO 8801178 A	25-02-1988
		WO 8801179 A	25-02-1988
		WO 8801180 A	25-02-1988
		US 5560929 A	01-10-1996
		US 5714166 A	03-02-1994
		AU 2118195 A	25-09-1995
		CA 2161684 A	14-09-1995
		DE 699079 T	25-09-1997
		EP 0699079 A	06-03-1996
		ES 2104518 T	16-10-1997
		FI 955320 A	24-11-1995
		GR 97300044 T	28-11-1997
		JP 8510761 T	12-11-1996
		NO 954434 A	05-01-1996

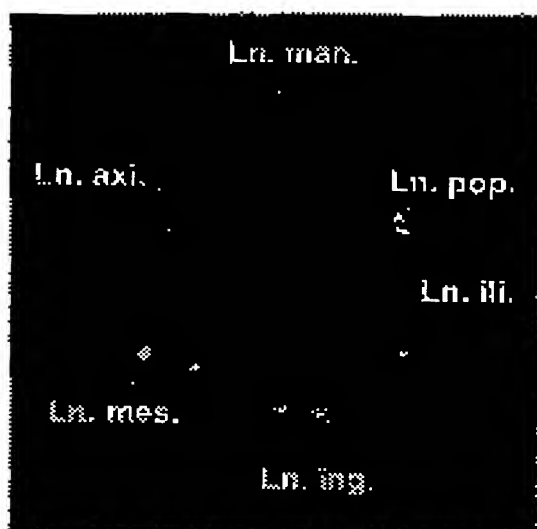


1

2

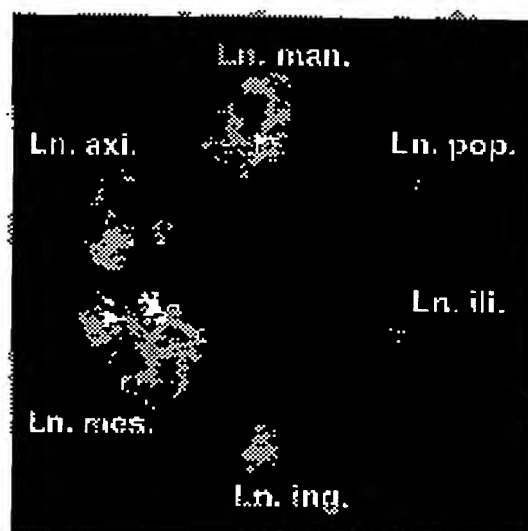
3

Abbildung 1



Präkontrast

Abbildung 2



24 h p.i.

